

**Lamin C2: Lokalisation und potentielle Funktion
dieses meiosespezifischen A-Typ Lamins
in Pachytänspermatozyten der Ratte**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Elisabeth von Glasenapp

aus

Osnabrück

Würzburg 2000

Ich versichere, die Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln erstellt zu haben.

Würzburg, den 8. November 2000

Eingereicht am : 8. November 2000

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Werner Goebel

1. Gutachter: Prof. Dr. Ricardo Benavente

2. Gutachter: Prof Dr. Holger Höhn

Tag des Promotionskolloquiums: 31.1.01

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

gewidmet
meinen Eltern
für
ihre großartige Unterstützung

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Ricardo Benavente für die Bereitstellung eines außergewöhnlich spannenden Themas und seine ständige Diskussionsbereitschaft und Geduld.

Prof. Holger Höhn danke ich für seine Unterstützung und die Bereitschaft sich als Gutachter zur Verfügung zu stellen.

Für die praktische Einführung in das Arbeitsgebiet bedanke ich mich herzlich bei Martina Kralewski und Manfred Alsheimer.

Darüberhinaus waren mir Manfred Alsheimer, Immo Hansen und Robert Hock im Umgang mit dem Computer eine große Hilfe.

Für geistige Inspiration möchte ich mich bei Prof. Georg Krohne, Dr. Robert Hock und Prof. Micheline Paulin-Levasseur bedanken.

Corinna Zünkler und Silke Hofbauer gilt mein Dank für die Unterstützung bei den Zellkultur- und Fotoarbeiten.

Vielen Dank auch an Claudia Gehrig, die an der Herstellung und Dokumentation der EM-Präparate beteiligt war.

Moralische Unterstützung habe ich insbesondere von Claudia Kölling-Schöne und Yukiko Imamichi erfahren.

Für die hervorragende Betreuung der Tiere gilt mein Dank Frau Klaus.

Allen anderen Mitarbeitern im Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre.

..... und dann gab's da noch die Geschichten eines Gene Roddenberry, die mich vor manch einer schlaflosen Nacht bewahrt haben.

Veröffentlichungen:

- 1. Alsheimer, M., von Glasenapp, E., Hock, R. und Benavente, R. (1999). Architecture of the nuclear periphery of rat spermatocytes: distribution of nuclear envelope proteins in relation to synaptonemal complex attachment sites. Mol. Biol. Cell 10:1235-1245**
- 2. von Glasenapp, E. und Benavente, R. (2000). Fate of meiotic lamin C2 in rat spermatocytes in the presence of okadaic acid. Chromosoma 109:117-122**
- 3. Alsheimer, M., von Glasenapp, E., Schnölzer, M., Heid, H. und Benavente, R. (2000). Meiotic lamin C2: The unique amino-terminal hexapeptide GNAEGR is essential for nuclear envelope association. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (in Druck)**

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.1.1	Aufbau der Tubuli seminiferi des Hodens der Ratte	2
1.1.2	Die Spermatogenese	2
1.2.	Die Meiose: ein Überblick	3
1.2.1	Die Rolle des "metaphase-promoting factors" (MPF) in der Meiose der männlichen Keimbahn	7
1.3	Die Kernhülle höherer eukaryontischer Zellen	7
1.3.1	Die Doppelmembran	8
1.3.2	Die Integralmembranproteine der Kernhülle in Interphase und Mitose	8
1.3.3	Die Kernlamina	11
1.3.3.1	Die Lamine: Die Grundstruktur und ihre posttranslationalen Modifikationen	11
1.3.3.2	A-Typ und B-Typ Lamine	13
1.3.3.3	Mitose-abhängige Modifikationen der Lamine	16
1.3.3.3.1	Ursprung der Lamine und ihre Bedeutung	17
1.3.3.4	Meiosespezifische Lamine	17
1.3.3.4.1	Lamin C2	18
1.3.3.4.2	Lamin B3	19
1.4	Der Synaptonemalkomplex	20
1.4.1	Die Proteine des Synaptonemalkomplexes	21
1.4.2	"Attachment Plaques"	21
1.4.3	Mögliche Funktion des Synaptonemalkomplexes	23
2.	Ziel der Arbeit	24
3.	Material und Methoden	25
3.1	Material	25

3.1.1	Antibiotika	25
3.1.2	Antikörper	25
3.1.2.1	Primärantikörper	25
3.1.2.2	Sekundärantikörper/Fluorochrom	26
3.1.2.2.1	Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper	26
3.1.2.2.2	Peroxidase-gekoppelte Antikörper	26
3.1.2.3	DNA-spezifisches Fluorochrom	26
3.1.3	Bakterienstämme	26
3.1.4	Chemikalien	26
3.1.5	Enzyme	28
3.1.5.1	Restriktionsenzyme	28
3.1.5.2	übrige Enzyme	28
3.1.6	Fotomaterial	29
3.1.7	Geräte	29
3.1.8	Kits	30
3.1.9	Marker (Protein/DNA)	30
3.1.10	Medien	30
3.1.11	Primer	31
3.1.12	Software	31
3.1.13	Vektoren	31
3.1.14	Versuchstiere	31
3.1.15	Zelllinien	31
3.2	Methoden	32
3.2.1	Herstellung von Gefrierschnitten für indirekte Immunfluoreszenz- mikroskopie	32
3.2.2	Immunlokalisation	32
3.2.3	Versuche mit Pachytänspermatozyten	32
3.2.3.1	Gewinnung von Pachytänspermatozyten aus Rattenhoden mittels zentrifugaler Elutriation	32
3.2.3.2	EM-Lokalisation von Laminen in der Kernhülle von Pachytän- spermatozyten	35
3.2.4	Zellkultur	37
3.2.4.1	Medium	37
3.2.4.2	Transfektion von COS7-Zellen mit Hilfe von Lipofectamin	37

3.2.4.2.1	Fixierung der transfizierten Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie	38
3.2.4.3	Immunzytologische Methoden	38
3.2.4.3.1	Beschichten von Deckgläschen mit Poly-L-Lysin	39
3.2.4.4	Kurzzeitkultur von Pachytänspermatozyten mit Okadasäure	39
3.2.5	Biochemische Methoden	40
3.2.5.1	Zellfraktionierung und Proteinausfällung von kultivierten Pachytänspermatozyten	40
3.2.5.2	SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen	40
3.2.5.3	Renaturierung der Proteine nach SDS-PAGE	44
3.2.5.4	Western Blot mit Tris-Norleucin-Puffer	44
3.2.5.5	Detektion der Proteinbanden auf der Nitrocellulosemembran	44
3.2.5.6	Antikörper-Inkubation	45
3.2.5.7	ECL-Detektion	45
3.2.5.8	Entwicklung der Röntgenfilme	45
3.2.5.9	Recycling der verwendeten Membran für einen zweiten Antikörper	46
3.2.6	Molekularbiologische Methoden	46
3.2.6.1	Medien für Bakterienkultur	46
3.2.6.2	Einfriermedium für Bakterien	46
3.2.6.3	Agarosegelelektrophorese	46
3.2.6.4	Ligationen	47
3.2.6.5	Herstellung kompetenter Bakterien	47
3.2.6.6	Transformation kompetenter Bakterien	48
3.2.6.7	Übernachtskultur einzelner Klone	48
3.2.6.8	Plasmid-DNA-Isolierung (Minipreps)	48
3.2.6.9	Kontrollverdau der Plasmid-DNA einzelner Klone	49
3.2.6.10	Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration im UV-Spektrometer	49
4	Ergebnisse	50
4.1	Lamin C2 in den Pachytänspermatozyten	50
4.1.1	Lokalisation von Lamin C2 im Hoden der Ratte mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie	50
4.1.2	Nachweis der 52 kDa-Bande von Lamin C2 in SDS-PAGE durch den mAk R27 und seine Nachweisgrenze	52

4.2	Immunlokalisation von Lamin C2, Lamin B1, LAPs2 und p62 in der Kernhülle von Pachytänspermatozyten	53
4.2.1	Immunfluoreszenzmikroskopie zur räumlichen Verteilung von Lamin C2 und anderen Kernhüllenproteinen im Vergleich mit dem Synaptonemalkomplexprotein 3	53
4.2.2	Räumliche Darstellung der Anheftungsstellen der Synaptonemalkomplexe (SCs) an der Kernperipherie von Pachytänspermatozyten	54
4.2.3	Immunfluoreszenzmikroskopie zur räumlichen Verteilung von Lamin C2 und anderen Kernhüllenproteinen im Vergleich zu Synaptonemalkomplexprotein 3	56
4.2.4	Elektronenmikroskopische Lokalisation von Lamin B1 und Lamin C2 im Vergleich zu den SC-Anheftungsstellen	58
4.3	Pachytänspermatozyten nach Kultur mit dem Phosphatasehemmer Okadasäure	60
4.3.1	Immunfluoreszenzmikroskopie von Pachytänspermatozyten ohne und nach Kultur mit Okadasäure	61
4.3.2	Western Blot von Pachytänspermatozyten mit mAk gegen Lamin C2 nach Behandlung mit Okadasäure	63
4.3.3	Das Schicksal weiterer Kernhüllenproteine beim Übergang zur Metaphase I	65
4.3.4	Auswirkungen auf LAPs2 nach vorzeitigem Entfernen der Okadasäure	68
4.4.	Expression von Lamin C2 in somatischen Zelllinien und die Auswirkung auf die Stabilität des Zellkerns somatischer Zellen	69
4.4.1	Expression von EGFP, Lamin C2-EGFP und Lamin C-EGFP in somatischen Zellen	70
4.4.2	Vergleich des Expressionsmusters von Lamin C2 mit und ohne EGFP in somatischen Zellen	71
4.4.3	Vergleich der Lokalisationen von Lamin B2 mit Lamin C2-EGFP bzw. C-EGFP in COS-7-Zellen	72
4.4.4	Verhältnis von Lamin C2 bzw. Lamin C zu den Lamina-assoziierten Polypeptiden 2 (LAPs2)	74

4.4.5	Lokalisation der Deletionsmutante von Lamin C2 und der Insertionsmutante von Lamin C im Zellkern von COS-7-Zellen	75
5	Diskussion	79
5.1	Lamin C2 ist innerhalb der Kernhülle von Spermatozyten lokal angereichert	79
5.2	Lamin C2 besitzt ein für Lamine neuartiges Membran-Adressierungs-Signal	80
5.3	Lamin C2 läßt sich am Ende der meiotischen Prophase nicht mehr nachweisen	81
	Aussicht	84
6.1	Zusammenfassung	85
6.2	Summary	86
7	Abkürzungen	87
8	Literaturverzeichnis	88
	Lebenslauf	102

1. Einleitung

1.1 Einführung

Aus den diploiden Stammzellen, den Gonien, entstehen im Verlauf der Spermatogenese bzw. Oogenese haploide Spermien bzw. Eizellen. Während der Paarung eines männlichen und eines weiblichen Organismus kommt durch Befruchtung einer Eizelle mit einem Spermium zur Verschmelzung beider Zellen und es entsteht eine diploide Zygote. Durch zahlreiche mitotische Teilungen und Ausdifferenzierungen von Geweben entsteht schließlich ein neuer Organismus.

Anders als bei einer mitotischen Zellteilung kommt es während der Keimzellbildung nicht nur zu einer einfachen Duplizierung des genetischen Materials, sondern es findet zusätzlich seine Neuordnung statt. Dabei werden nicht nur die Chromosomen mütterlicher und väterlicher Herkunft neukombiniert, sondern auch chromosomale Abschnitte zwischen dergleichen, d.h. den homologen Chromosomen, werden ausgetauscht.

Auf eine vorausgegangene Verdopplung (Replikation) der DNA folgt die Trennung (Segregation) der homologen Chromosomen, die 1. Meiotische Teilung. Der Chromosomensatz wird geteilt und die homologen Chromosomen werden auf die beiden Tochterzellen verteilt. Dieser sogenannten Reduktionsteilung folgt die 2. Meiotische Teilung, durch die nun die Schwesterchromatiden voneinander getrennt werden. So entstehen insgesamt vier haploide Tochterzellen. Diese zweite Zellteilung ist mit der Mitose in somatischen Zellen vergleichbar, während bei der 1. Meiotischen Teilung schon im Vorfeld der eigentlichen Segregation umfangreiche Umstrukturierungen und einzigartige Prozesse vorausgehen. Zu diesen gehören die Anheftung der Chromosomenenden an die Kernhülle, die Paarung der homologen Chromosomen, die Synapse der homologen Chromosomen, die Bildung der Chiasmata u.a.. Die Chromosomen liegen währenddessen nicht passiv im Zellkern, sondern vollführen umfangreiche Bewegungen, wobei sogar die Chromosomenenden, die an der Kernhülle verankert sind, sich lateral innerhalb

dieser bewegen. Eine vergleichbare Dynamik der Chromosomen ist aus somatischen Zellen nicht bekannt und verdient deshalb besondere Aufmerksamkeit.

1.1.1 Aufbau der Tubuli seminiferi des Hodens der Ratte

Der Hoden besteht aus einer Ansammlung von Kanälchen, den sogenannten Tubuli seminiferi. Diese gehen schleifenförmig von einem Kanalnetz ab, das mit dem Nebenhoden in Verbindung steht. In dem lockeren Bindegewebe zwischen den Tubuli liegen die Leydigzellen, die als Testosteronproduzenten eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der primären Geschlechtsmerkmale und der Steuerung der Keimzellbildung spielen.

Die der Basallamina aufliegenden Stammzellen, die Spermatogonien, sowie die dazwischen liegenden somatischen Sertolizellen bilden über spezielle Zell-Zellkontakte eine funktionelle Einheit (Russell, 1977). Über diese leiten sie neben Stoffwechselprodukten u.a. auch Hormonsignale wie Testosteron oder FSH ("follicle-stimulating hormone") weiter (Stern, 1993), um die Entwicklung der Keimzellen zu steuern. Die Synzytien vergleichbare Organisation synchronisiert dabei die Entwicklung der Keimzellen, so daß diese in Zyklen verläuft. Aufgrund der unterschiedlichen Dauer einzelner Entwicklungsabschnitte treten allerdings in einem Tubulusabschnitt nie alle Stadien gleichzeitig auf. Eine Bestimmung des Entwicklungsstadiums ermöglichen dabei sowohl die Morphologie als auch die relative Lage der Keimzellen im Tubulus, da mit fortschreitender Entwicklung die Zellen Richtung Tubuluslumen wandern. Die Keimzellen werden erst als Spermien aus diesem Zellverband entlassen und sammeln sich im Lumen, von wo sie zur Reifung in den dem Hoden aufliegenden Nebenhoden wandern.

Die Entwicklung der Spermien, als Spermatogenese bezeichnet, verläuft in mehreren Abschnitte: **1. Proliferation:** Die Spermatogonien teilen sich mitotisch, wobei die eine Tochterzelle als Stammzelle verbleibt, während die andere weitere mitotische Teilungen durchläuft. **2.** In der anschließenden **Meiose** (siehe 1.2.1) erfahren diese jetzt als Spermatozyten bezeichneten Zellen nach der Duplikation der Chromosomen eine massive Umorganisation insbesondere des genetischen Materials, gefolgt von zwei Zellteilungen, die schließlich in je vier runden haploiden Keimzellen, den Spermatiden resultieren. **3. Differenzierung:** Die Ausdifferenzierung der postmeiotischen Zellen zu Spermien mit ihrer

charakteristischen Kopf-Schwanz-Morphologie wird als Spermiogenese bezeichnet und schließt die Spermatogenese ab. In Verlauf der Spermiogenese wird das Chromatin extrem kondensiert und transkriptionell inaktiviert (Clermont et al., 1993, Eddy und O'Brien, 1994, Hecht, 1995). U.a. werden dabei Bestandteile der Kernhülle wie die Kernporenkomplexe (Fawcett und Chemes, 1979) oder Lamina-assoziierte Polypeptide (LAPs2) auf eine Seite des Zellkerns verlagert (Alzheimer et al., 1999).

In Tabelle 1 ist die Dauer der einzelnen Entwicklungsabschnitte für die Ratte dargestellt. Sie erreicht mit etwa 36 Tagen die Geschlechtsreife und die Spermatogenese läuft von da an kontinuierlich ab.

Alter der Ratte in Tagen	Stadien
6-7	somatische Zellen und Spermatogonien
13-14	erste Spermatozyten im Leptotän
17-18	erste Spermatozyten im Zygotän
19-20	Spermatozyten im frühen Pachytän
22-23	Spermatozyten im späten Pachytän
24-25	erste runde Spermatiden
30-31	längliche Spermatiden
ab 36	Spermatozoa/Spermien

Tabelle 1.1: Zeitlicher Ablauf der verschiedenen Entwicklungsstadien im Hoden (nach Malkov et al., 1998)

1.2 Die Meiose: ein Überblick

Nach mehreren mitotischen Teilungen der Spermatogonien (Lin, 1998; de Rooij und Grootegoed, 1998) treten die entstandenen Zellen mit einer Replikation der DNA ins Präleptotän der 1. meiotischen Teilung ein (Stern und Hotta, 1987). Diese **primären Spermatozyten** ($4n$) durchlaufen eine stark verlängerte Prophase I, die gekennzeichnet ist von einer starken zum Ende hin abnehmenden Bewegung der Chromosomen (Parvinen und Söderström, 1976; Scherthan et al., 1996), die mit der Paarung, der Synapsenbildung der homologen Chromosomen und einer starken Zunahme des Kondensationsgrades des Chromatins unter Verkürzung der Chromosomen einhergeht. Die gepaarten homologen Chromosomen (= 4 Chromatiden) werden als Bivalent bezeichnet. Im Verlauf der Prophase I findet an mindestens einer Stelle innerhalb eines jeden Bivalents ein Rekombinationsereignis (Wolf, 1994; Übersicht in Pittman und Schimenti, 1998) statt, wobei es zum

umfangreichen Austausch genetischen Materials zwischen den homologen Chromosomen kommt.

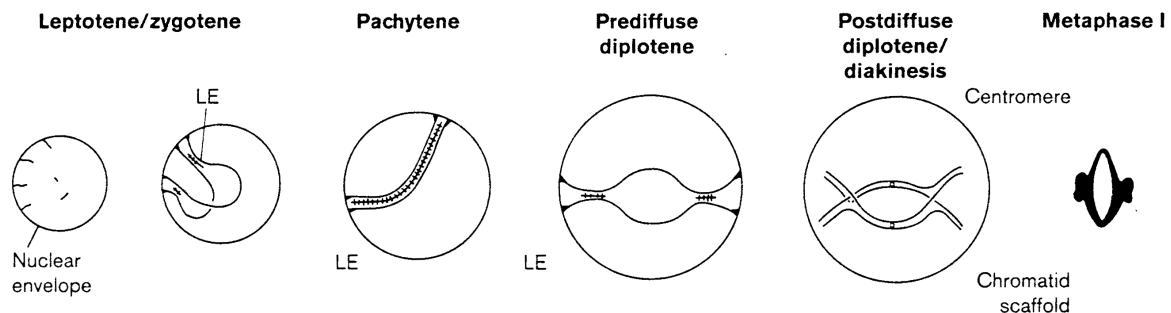


Abb.1.1: Schema der Prophase (aus Heyting, 1996)

Aufgrund der langen Dauer läßt sich die Prophase I in folgende Entwicklungsabschnitte gliedern: Leptotän, Zygotän, Pachytän und Diplotän (siehe Abb.1.1), die wie folgt charakterisiert sind:

Das **Leptotän** (gr.: leptos , dünn, fein; tainia: Band) bezeichnet den Beginn der Kondensation des Chromatins bis die Chromosomen als dünne Fäden sichtbar werden. Eine Unterscheidung einzelner Chromatiden ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich. Beide Enden eines Chromosoms heften sich an die Innenseite der Kernhülle (Bass et al., 1997; Übersichten in Dernburg et al., 1995; Zickler und Kleckner, 1998) und entlang der Chromosomenachsen bilden sich mehrere Abschnitte, die später im Zygotän längs der Chromosomenachsen zu Lateralelementen (LE, Abb.1.1) verschmelzen.

Beim Übergang zum **Zygotän** (gr.: zygos, Joch, Brücke) beginnen sich die homologen Chromosomen zu paaren und zwischen den Lateralelementen bilden sich proteinöse Querverbindungen, so daß eine scheinbar dreiteilige Struktur entsteht, die als Synaptonemalkomplex bezeichnet wird. Diese Synapse findet nur nach der Paarung der homologen Chromosomen statt und beginnt an mehreren Stellen gleichzeitig, aber immer auch in der Nähe der Chromosomenenden (siehe Abb.1.1; Dernburg et al., 1995).

Zusätzlich bildet sich eine mehr oder weniger markante Bouquet-Struktur aus, die sich mit Beginn des Pachytäns wieder auflöst (Übersicht in Zickler und Kleckner, 1998 und Dernburg et al., 1995) und dadurch gekennzeichnet ist, daß alle Telomere zu einem kleinen Bereich innerhalb der Kernhülle wandern (Bass et al., 1997), während die Chromosomen schleifenförmig in das Kerninnere ragen. Bei Ratte und

Maus ist diese Bouquetstruktur allerdings nur ansatzweise vorhanden (Scherthan und Cremer, 1994, Bass et al., 1997).

Gleichzeitig findet eine Volumenzunahme des Zellkerns ab dem frühen Zygotän statt, die erst im Pachytän endet. Im Verlauf der meiotischen Prophase verschwinden die starken Einstülpungen der Kernmembran aus der prämeiotischen Interphase (Übersicht in Zickler und Kleckner, 1998).

Im Verlauf des **Pachytäns** (gr.: pachys, dick) steigt der Kondensationsgrad des Chromatins weiter und die Ausbildung des Synaptonemalkomplexes zwischen den homologen Chromosomen ist vollständig (von Wettstein et al., 1984). Es ist so eine dreiteilige Struktur aus den beiden homologen Chromosomen und mindestens vier verschiedenen Proteinen (siehe auch Abschnitt 1.4) entstanden, die in zwei Lateralelemente und ein Zentralelement unterteilt werden kann. Letzteres scheint durch die Überlappung querverlaufender proteinöser Fasern zu entstehen (siehe auch Abschnitt 1.4). Wie Vázquez-Nin et al. 1993 in elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen konnten, ist zwischen den Lateralelementen und dem Zentralelement nur selten DNA vorhanden. Das Chromatin bildet ausgehend von den LE Schleifen, die in das Nukleoplasma ragen (Rattner et al., 1980, Schema siehe Abb.1.6).

Aufgrund der verhältnismäßig langen Dauer dieses Stadiums (ca. 4 Tage bei der Ratte) können als frühes, mittleres und spätes Pachytän unterschieden werden. Im frühen Pachytän nimmt der Kondensationsgrad des Chromatins weiter zu, wobei die gepaarten homologen Chromosomen kürzer und dicker werden. Zu diesem Zeitpunkt werden sogenannte frühe Rekombinationsknoten sichtbar, denen ein Zusammenhang mit der Rekombination zwischen den homologen Chromosomen zugeschrieben wird (Übersicht in Ashley, 1994).

Mit Eintritt in das **Diploötän** (gr.: diplous: doppelt, paarweise) ist der maximale Kondensationsgrad der Chromatins erreicht, die SC-Enden lösen sich von der Kernhülle und die Auflösung des Synaptonemalkomplexes zwischen den homologen Chromosomen setzt ein (Übersicht in Zickler und Kleckner, 1998). Die Chiasmata - die als Orte der vorausgegangenen Rekombinationsereignisse gelten - werden ab dem Diploötän sichtbar (Übersicht in Ashley, 1994) und sind die Bereiche an denen die Chromosomen am längsten verbunden bleiben. Die Schwesterchromatiden heben nun sich deutlich voneinander ab, bleiben aber weiterhin miteinander verbunden.

Die Prophase I endet mit der **Diakinese I** (gr.: kinesis, Bewegung), in der sich die Bivalente in die Zellmitte bewegen. Die Chiasmata wandern Richtung Telomere bis nur noch 2 Chiasmata - eines an jedem Ende - übrigbleibt. Die Diakinese endet mit dem Auflösen der Kernhülle (siehe Abschnitt 1.3).

In der **Metaphase I** ordnen sich die Bivalenten im Zentrum der Zelle so an (Zickler und Kleckner, 1999), daß ihre Chromosomenarme in einer Ebene (= Äquatorialplatte) angeordnet werden während sich die beiden Kinetochore eines Bivalents an die entgegengesetzten Teilungsspindeln heften.

Die Segregation betrifft in der **Anaphase I** (gr.: ana, hinein, hinauf) nur die homologen Chromosomen, weil durch Anheftung eines meiosespezifischen Spindelapparates an das gemeinsame Kinetochor jedes Schwesterchromatidenpaares und noch bestehender Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden eine Trennung unterbunden wird.

Sind die homologen Chromosomen zu den entgegengesetzten Polen der primären Spermatozyten gewandert, bilden sich in der **Telophase I** (gr.: telos, Ziel, Ende) zwei neuen Kernhüllen und durch Einschnürung des Zytoplasmas entstehen zwei neue Zellen. Diese **sekundären Spermatozyten**, die noch aufgrund der vorangegangenen DNA-Replikation noch den doppelten Chromosomensatz ($2n$) besitzen treten sofort in eine 2. meiotische Teilung ein, die mit einer mitotischen Teilung vergleichbar, die Schwesterchromatiden voneinander trennt. Die daraus hervorgehenden haploiden **runden Spermatiden** differenzieren sich in der Spermiogenese zu reifen **Spermien** aus.

Parallel zu den morphologischen Veränderungen der Chromosomen im Vorfeld der beiden meiotischen Teilungen durchläuft auch die Kernhülle eine umfassende Umgestaltung, die bisher vergleichsweise geringe Beachtung erhielt. So sind die Zellkerne während der Prophase I durch eine erhöhte **Fragilität** gekennzeichnet, die möglicherweise auf die Besonderheiten der Laminastruktur in Spermatozyten zurückzuführen ist (Alzheimer et al., 1999, s.1.3.3).

Die seit dem Leptotän in der Kernhülle inserierten Telomere wandern während der gesamten Prophase I innerhalb der Kernhülle. Die Gruppierung der Telomere am Ende des Leptotäns erfolgt dabei nicht zufällig (Bass et al., 1997; Pandita et al., 1999). Wie Parvinen und Söderström schon 1976 eindrucksvoll zeigen konnten, nimmt diese **Bewegung** zum Ende des Pachytän dramatisch ab. Die dafür

notwendigen Motoren für diese scheinbar ungerichteten Bewegungen wurden zwar diskutiert (Übersicht in Sawin und Endow, 1993; Sperry und Zhao, 1996; Navolanic und Sperry, 2000), konnten aber noch nicht identifiziert werden.

1.2.1 Die Rolle des "metaphase-promoting factors" (MPF) in der Meiose der männlichen Keimbahn

Mittlerweile finden sich zahlreiche Hinweise, daß einige der beteiligte Faktoren am mitotischen Zellzyklus auch am meiotischen Übergang von der Prophase I zur Metaphase I beteiligt sind. So konnten z. B. die cdc2-Kinase, auch als **p34cdc2-Kinase** bezeichnet, die **CDC25C-Proteinphosphatase** und **Cyclin B1** in Pachytänspermatozyten nachgewiesen werden (Tarsounas et al., 1999). Die CDC25C-Proteinphosphatase dephosphoryliert p34cdc2 und ermöglicht so die Bildung des p34cdc2/Cyclin B1-Komplexes, auch **metaphase-promoting factor (MPF)** genannt, der für die Einleitung der Metaphase in mitotischen Zellen verantwortlich ist und mit einer metaphase-spezifischen Phosphorylierung der Lamine einhergeht (Peter et al., 1990, 1991). Cobb et al. zeigten 1999, daß während der gesamten meiotischen Prophase I sowohl cdc2 als auch Cyclin B1 vorhanden ist, wohingegen CDC25C-Kinase erst ab dem Pachytän zusammen mit dem meiosespezifischen Histon H1t auftritt, so daß die Regulation von CDC25C als ein möglicher Schalter für die Beendigung der Prophase anzusehen ist. Im Vergleich zum mitotischen Zellzyklus ist relativ wenig über die beteiligten Komponenten bekannt, aber zahlreiche meiosespezifische Proteinvarianten wie Cyclin A1 (Ravnik und Wolgemuth, 1999) deuten auf eine Vielzahl an Besonderheiten während der beiden meiotischen Teilungen hin.

1.3 Die Kernhülle höherer eukaryontischer Zellen

Die Kernhülle von somatischen und meiotischen Zellen besteht aus der Doppelmembran sowie der ihr auf der Innenseite aufgelagerten **Kernlamina** (Aebi et al., 1986; Übersicht in Stuurman et al., 1998), mit der sie über Transmembranproteine und Kernporenkomplexe verbunden sind. Letztere sind in die

Kernhülle integriert und dienen dem Transport zwischen Zytoplasma und Nukleoplasma (Übersichten in Görlich, 1997 und Nigg, 1997).

1.3.1 Die Doppelmembran

Die äußere Kernmembran ist ein Teil des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und bleibt in ständigem Kontakt zu ihm, während die innere Kernmembran nur über die Kernporenkomplexe in Kontakt mit der äußeren Membran kommt. In der Mitose zerfällt die Membran in kleinere Vesikel, die in der Telophase wieder zu einer Doppelmembran fusionieren (Yang et al., 1997a). Welche Rolle dabei integrale Proteine der inneren Kernmembran, wie z. B. LAPs2 und Emerin, spielen, ist noch nicht geklärt (Dabauvalle et al., 1999). Eine Kolokalisation mit anderen Kernhüllenproteinen weist jedoch auf eine Funktion beim Zusammenbau der Kernhülle in der Telophase hin, auf die im folgenden genauer eingegangen wird.

1.3.2 Die Integralmembranproteine der Kernhülle in Interphase und Mitose

Zu den integralen Proteinen der inneren Kernmembran gehören neben den sogenannten Lamina-assoziierten Polypeptiden (LAP1A-C, LAPs2) auch p58 (=Lamin B Rezeptor, LBR) und Emerin. Sie besitzen eine oder mehrere Transmembrandomänen sowie Kernhüllerkennungssequenzen. Daneben konnte zumindest in *in vitro* Versuchen weitere Bindungsdomänen für Lamine und Chromatin nachgewiesen werden (Clements et al., 2000; Fairley et al., 1999; Duband-Goulet, 1998)

Die in Säugerzellen gefundenen Lamina-assoziierten Polypeptide 1 (**LAP1A-C**) sind vermutlich drei differenzielle Splicingvarianten eines Gens. Diese Isotypen haben ein Molekulargewicht von Mr 75.000 (LAP1A), 68.000 (LAP1B) und 55.000 (LAP1C) (Senior und Gerace, 1988; Foisner und Gerace, 1993, Martin et al., 1995). Während der Interphase bildet LAP1 Multimere, die in der inneren Membran verteilt sind und spezifisch mit A-Typ Laminen assoziiert sind (Maison et al., 1997).

LAP1C bildet mit Lamin B1 einen Komplex, der außerdem noch eine Proteinkinase enthält, über deren Funktion weiter nichts bekannt ist. Bei Auflösung der Kernhülle verbleibt LAP1 an Vesikeln, an die auch Lamin B1 gebunden ist (Maison et al., 1997).

Das Lamina-assoziierte Polypeptid 2 (**LAP2**) wurde zuerst in Ratte nachgewiesen (Foisner und Gerace, 1993, Übersicht in Dechat et al., 2000) und zeigte nach der Sequenzierung (Furukawa et al., 1995) auf Aminosäureebene eine Identität von 91% zu dem von Harris et al (1994) sequenzierten humanen Thymopoietin β (TP β) besitzt (siehe auch Alsheimer et al., 1998). Mit Molekulargewichten von 75.000, 51.000 und 39.000 (Harris et al., 1994) sind die **LAP2/Thymopoietine α , β und γ** genannten die meist vorkommenden bei Mensch und Ratte. Wie in Abb. 1.2 dargestellt, ist der N-Terminus von LAP2/TPs bei allen Splicingvarianten identisch (1-187 AS), während LAP2/TP α im Gegensatz zu LAP2 β und LAP2 γ keine Transmembrandomäne besitzt, stattdessen aber eine Lamin-B-Bindungs-Domäne. LAP2 β und LAP2 γ unterscheiden sich nur dadurch, daß LAP2 γ die Aminosäuren 221-329 fehlen. Das Gen setzt sich aus acht Exons zusammen, die sich über ungefähr 35 kb erstrecken. Die Exons 1-3 kodieren den bei allen Isotypen identischen N-Terminus, Exon vier kodiert die LAP2 α spezifische Sequenz. Die Exons fünf bzw. sieben und acht kodieren für die erste bzw. zweite Hälfte des gemeinsamen Teils von LAP2 β und LAP2 γ . Exon acht enthält die potentielle Transmembrandomäne (Harris et al., 1995). LAP2 α verteilt sich gleichmäßig im Kern unter Aussparung der Nukleoli. Außer einer Kolo-kalisation mit Laminen in einigen Zellzyklusstadien konnten bisher keine Interaktionen nachgewiesen werden (Dechat et al., 1998).

Die Splicingvarianten β und γ besitzen neben einer chromatinbindenden auch eine Transmembran-Domäne sowie eine Lamin B-bindende Sequenz (Furukawa et al., 1998). Am N-Terminus liegt die Chromosomenbindungsstelle. Am C-Terminus besitzen LAP2 β und γ eine Transmembrandomäne, die es ermöglicht, daß LAPs2 auch während der Mitose an Membranvesikel gebunden bleibt (Yang et al., 1997a). LAP2 β scheint nach neueren Ergebnissen aus *in vitro* Untersuchungen von Gant et al. (1999) auf den Zusammenbau der Lamina, der Anheftung des Chromatins an die Kernhülle sowie eventuell auf die Replikation durch Veränderung der Chromatins Einfluß zu nehmen.

Die Kernhüllenerkennungsdomäne fällt mit der Lamin-B-Bindungsstelle zusammen, die nicht mit der Chromatininteraktionsdomäne identisch ist (Furukawa et al., 1995; 1998).

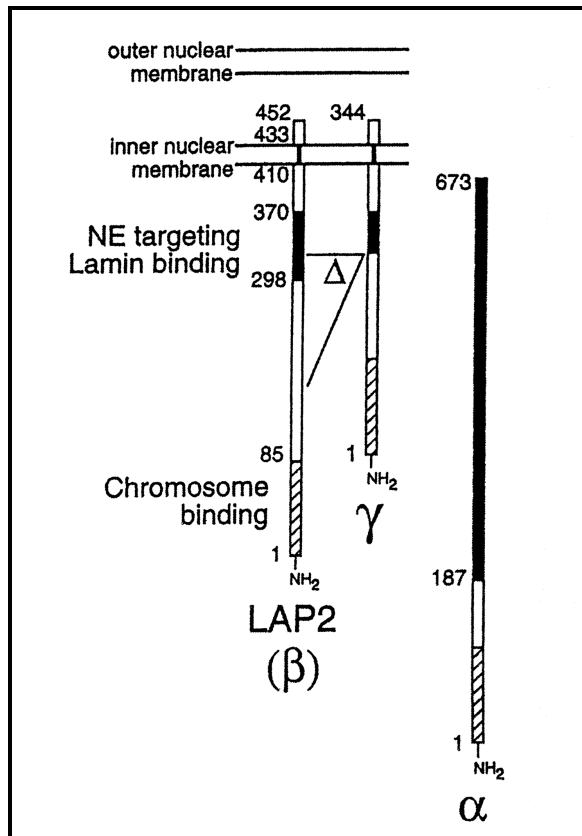


Abb.1.2: Vergleich der drei Splicingvarianten von LAPs2 (aus Furukawa et al., 1998)

Darüberhinaus gibt es weitere Integralsmembranproteine, die hier nur kurz erwähnt werden sollen:

p58 (=LBR) (Drummond et al., 1999; Chu et al., 1998) besitzt acht potentielle Transmembrandomänen und bindet nicht wie ursprünglich angenommen mit Lamin B. Eine chromatinbindende Domäne in der ersten Hälfte der nukleoplasmatischen Domäne deutet auf eine Funktion im Zusammenhang mit der Organisation von Chromatin hin (Ye und Worman, 1994). Daneben konnten Phosphorylierungsstellen nachgewiesen werden (Nikolakaki et al., 1997), die nach Auflösung der Kernhülle phosphoryliert vorliegen (Foisner und Gerace, 1993; Ellenberg et al., 1997)

Emerin ist ein 34 kDa großes Protein, das von dem EMD Gen in Xq28 beim Menschen kodiert wird. Immunlokalisationen zeigen besonders starke Signale für Emerin am Ende der Telophase (Dabauvalle et al., 1999) und deuten so auf eine mögliche Beteiligung an der Organisation des Chromatins hin. Es ist ein Lamin-A-bindendes Integralsmembranprotein, dessen Mutationen zu schwerwiegenden Muskelerkrankungen wie der Emery-Dreifuß-Muskeldystrophie führt (Dabauvalle et al., 1999). Diese kann aber ebenso durch eine Mutation im Lamin A/C-Gen hervorgerufen werden, die dann autosomal recessiv vererbt wird (Felice et al., 2000; Übersicht in Emery, 2000).

1.3.3 Die Kernlamina

Die Kernlamina ist ein proteinöses Netzwerk (Aebi et al., 1986), das bei allen höheren Eukaryonten nachgewiesen wurde, und die über zahlreiche integrale Membranproteine mit der inneren Kernmembran verbunden ist.

Hauptkomponenten der Lamina sind die sogenannten Lamine, die zur Familie der Intermediärfilamente gerechnet werden (Foisner, 1997; Fisher et al., 1986; Lehner et al., 1986; Krohne und Benavente, 1986; McKeon et al., 1986) und die im Zentrum dieser Arbeit stehen. Die Expression und das Mengenverhältnis in dem die einzelnen Lamine innerhalb der Kernlamina vorkommen schwankt von Zelltyp zu Zelltyp und Entwicklungsstadium zu Entwicklungsstadium erheblich (Vester et al., 1993, Alsheimer et al., 1999; Nakamachi und Nakajima, 2000). Bei jeder Mitose kommt es neben der Auflösung der Kernmembran auch zur Auflösung der Kernlamina (Moir et al., 2000).

1.3.3.1 Die Lamine: Die Grundstruktur und ihre postranslationelle Modifikation

Die Lamine weichen in einigen Punkten deutlich von den übrigen Intermediärfilamentproteinen ab. So gelangen die Lamine dank eines im Carboxyterminus gelegenen Kernlokalisationssignals in das Kerninnere und bilden dort auf der Innenseite der inneren Membran die Kernlamina. Daneben enthält ihre α -helikale Domäne gegenüber den übrigen Intermediärfilamentproteinen sechs zusätzliche Heptadenrepeats, kurze Sequenzwiederholungen von sieben Aminosäuren, die an der Bildung von coiled-coil-Domänen beteiligt sind.

Wie in Abb.1.3 dargestellt, enthält die Schwanzdomäne (210-300 Aminosäuren) nahe der zentralen Domäne ein Kernlokalisationssignal (NLS) (Loewinger und McKeon, 1988; Lanford und Butel, 1984; Kalderon et al., 1984) und am C-Terminus eine CaaX-Box (Hancock et al., 1989; 1991; Firmbach-Kraft und Stick, 1993; Holtz et al., 1989), die allerdings bei einigen Laminen (Lamin C und C2, siehe 1.3.2.1) durch alternatives Splicing verloren geht (C steht für Cystein, a für eine beliebige aliphatische Aminosäure und X für jede beliebige Aminosäure, meistens steht dort ein Methionin) (Übersicht in McKeon, 1991). Noch im Zytoplasma wird das Cystein (siehe Abb.1.3.) posttranslationell durch ein Isoprenoid, hier einen Farnesylrest (Beck

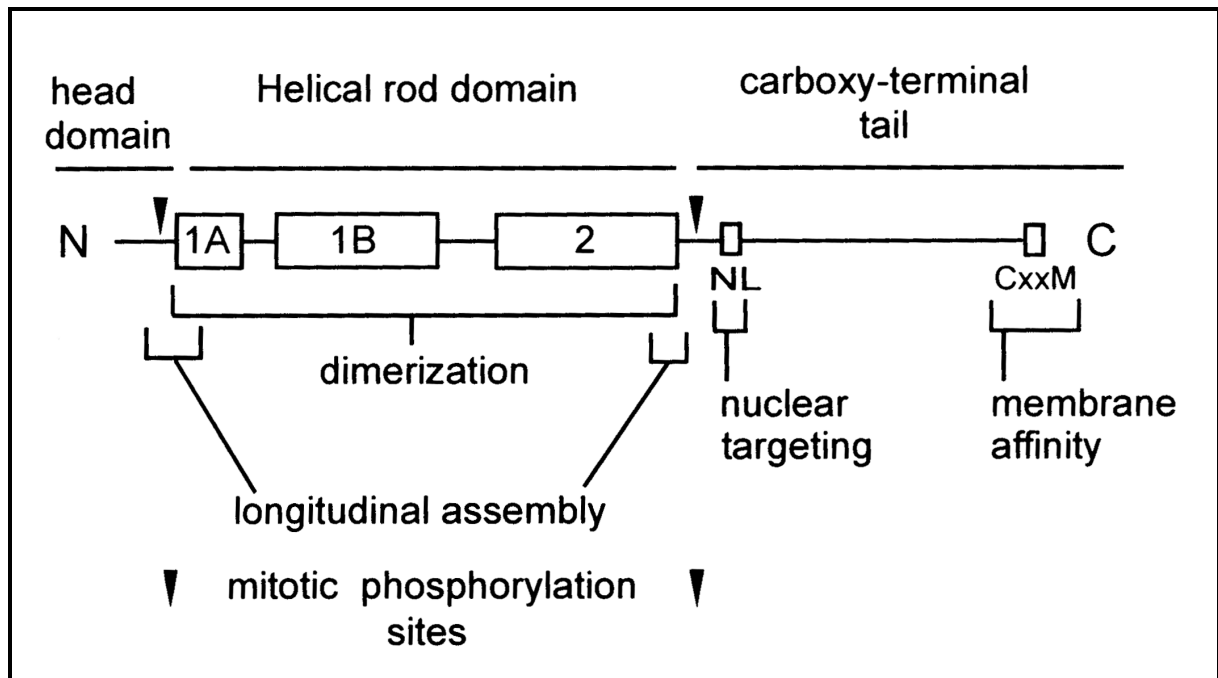


Abb.1.3: Grundstruktur eines Lamins. Abweichungen wie bei Lamin C, und den meiosispezifischen Laminen C2 und B3 werden im Text erläutert (aus Krohne, 1998)

et al.,1990; Übersicht in Moir et al., 1995), modifiziert (Abb. 1.5) und der Rest der CaaX-Box mit dem C-Terminus proteolytisch abgespalten. Die Farnesylgruppe kann aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften mit Membranen interagieren und ermöglicht so Proteinen eine Interaktion mit einer Membran (Holtz et al.,1989, Willumsen und Christensen, 1984). Weitere Bindungsmechanismen sind jedoch für einen stabilen Einbau in die Kernlamina notwendig. Die Modifikation der CaaX-Box, die die Voraussetzung für eine Interaktion mit der Kernmembran ist, bleibt nur bei B-Typ Laminen dauerhaft erhalten.

Wie in Abb. 1.3 dargestellt konnten bisher vier verschiedene Interaktionen den einzelnen Abschnitten zugeordnet werden: So erfolgt die **Dimerisierung** der Lamine posttranslationell, indem zwei Lamine parallel, das heißt N-Terminus neben N-Terminus, über die coiled-coil-Domänen interagieren. Die C-Termini sind daran nicht beteiligt und ragen mit ihrer globulären Struktur zur Seite (Übersicht in Stuurman, 1998; Krohne, 1998). Die terminalen Sequenzen der Stabdomäne sind hochkonserviert und sind zusammen mit den nicht α -helikalen Nachbarsequenzen für das Assembly der Dimere in Längsrichtung notwendig. Die Dimere polymerisieren dabei in **Kopf-Schwanz-Orientierung** (Heitlinger et al., 1991; Krohne, 1998; Übersicht in Stuurman et al., 1998). Der in Abb.1.4 unter A und B dargestellte

Aufbau von Lamin-Dimeren und -Polymeren stimmt mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen überein (Stuurman et al., 1998), während eine parakristalline Erscheinung bei der lateralen Aggregation möglicherweise nur in *in vitro* Experimenten auftritt (Abb.1.4C) (Gieffers und Krohne, 1991; Krohne, 1998).

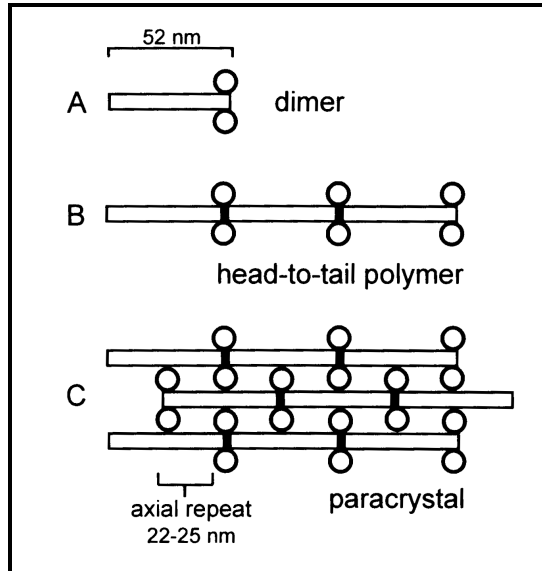


Abb.1.4: Dimer und Polymerbildung von Laminen (nach Krohne, 1998).

Der Balken stellt die Stabdomäne mit N-Terminus und der Kreis den globulären C-Terminus der Lamine dar.

1.3.3.2 A-Typ und B-Typ Lamine

Die bisher bekannten Lamine bei Säugern werden von drei verschiedenen Genen codiert, die 12 Exons (Lin und Worman, 1993) enthalten und die durch alternatives Splicing der mRNA insgesamt sieben verschiedene Proteine hervorbringen, von denen zwei meiosespezifisch sind. Sie besitzen eine Größe von 50-75 kDa. Es gibt zwei Gruppen von Laminen: Die A-Typ Lamine, zu denen **Lamin A**, **C** und **C2** (ein Gen) sowie eine weitere Splicingvariante von A ($\Delta 10$, Machiels et al., 1995) gerechnet werden und die B-Typ Lamine (zwei Gene, Höger et al., 1988; 1990), zu denen Lamin **B1**, **B2** und **B3** gehören. Die Typen unterscheiden sich sowohl in Bindungseigenschaften - B-Typ-Lamine können von LAPs2 gebunden werden- als auch durch den **isoelektrischen Punkt**: A-Typ Lamine besitzen einen isoelektrischen Punkt im neutralen Bereich während bei B-Typ Laminen dieser im sauren ($\text{pH} \leq 5.6$) liegt.

Während B-Typ Lamine in allen höheren Zellen vorkommen, lassen sich **A-Typ Lamine** nur in **differenzierten** Zellen nachweisen (Übersicht in Krohne, 1998; Stuurman et al. 1998). Daß ihre Expression als Folge der Differenzierung auftritt und sie diese nicht selbst induzieren können, zeigten Peter und Nigg bereits 1991 durch die ektopische Expression von Lamin A in embryonalen Carcinomazellen. Ein

kürzlich im Promoter des Lamin A/C-Gen gefundenes retinoic acid-responsive element (Okumura et al., 2000) könnte die Erklärung liefern, warum die Expression von Lamin A und C erst mit der Differenzierung stattfindet, denn das Vitamin A-Derivat Retinsäure induziert die Differenzierung zahlreicher Zellen (Übersichten in Rohwedel et al., 1999 und Napoli, 1999).

Das Lamin A/C Gen erstreckt sich über 12 Exons: Die Kopfdomäne (der Aminoterminal) und ein Teil der α -helikalen Stabdomäne 1A wird von Exon 1, der Großteil der Stabdomäne von den Exons 2-6 und der Schwanz von den Exons 7-9 kodiert. Das NLS stammt aus Exon 7. Lamin A besitzt darüberhinaus noch das komplette Exon 10, in dem auch die alternative 5'-Splicingstelle für die mRNA von Lamin C liegt, sowie Exon 11 und das Exon 12 mit der CaaX-Box (Lin und Worman; 1993). Gieffers und Krohne (1991) und Moir et al. (1991) kommen in *in vivo* Expressionsstudien hinsichtlich der Notwendigkeit des carboxyterminalen Endes zu dem Ergebnis, daß dieser Bereich auf die laterale und longitudinale Interaktion zwischen A-Typ Laminen keinen grundlegenden Einfluß hat. Lamin C kann nur mit Hilfe von Lamin A in die Kernlamina eingebaut werden, da ihm die CaaX-Box und damit der hydrophobe Anker für die Kernmembran fehlt (Riedel und Werner, 1989, Nakajima und Sado, 1993). Ohne dieses bleibt das Protein diffus im Kern verteilt (Krohne et al., 1989; Horton et al., 1992; Pugh et al., 1997)

Da die Bindungsstudien aber nur *in vitro* bzw. durch ektopische Expression durchgeführt wurden, fehlt der direkte Nachweis für die Bindungsverhältnisse zwischen den Laminen innerhalb der Kernlamina (Krohne et al., 1998; Klapper et al., 1997; Übersichten in Krohne, 1998 und Stuurman et al., 1998) und mit Chromatin im Verlauf der Mitose (Glass et al., 1993; Glass und Gerace, 1990; Taniura et al., 1995; Paddy et al., 1990; Lourim und Krohne, 1998).

Zahlreiche Untersuchungen weisen deutliche Unterschiede hinsichtlich Proteinreifung und Einbaumechanismen in die Lamina auf: So entsteht Lamin A aus einem Vorläuferprotein, als **Prälamina A** bezeichnet, das als solches vorübergehend in intranukleären Foci lokalisiert werden kann (Sinensky et al., 1994a, 1994b; vergleiche Dyer et al., 1999 Pugh et al., 1997; Sasseville und Raymond; 1995) und dessen Funktion bisher unklar ist.

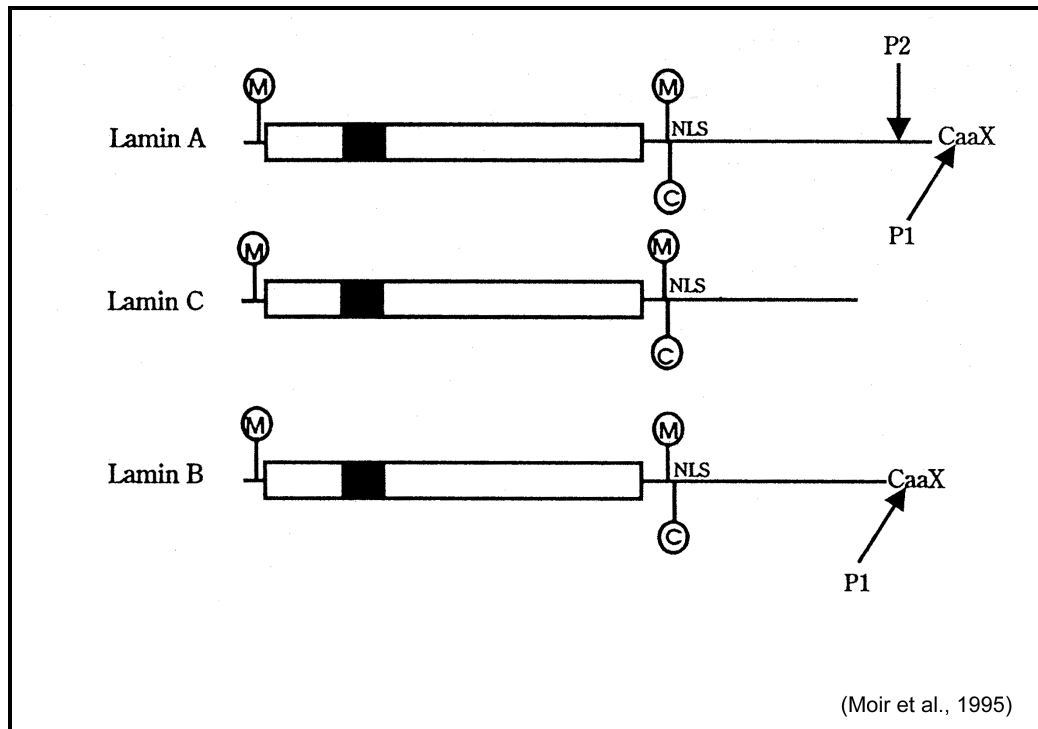


Abb.1.5: Schematischer Aufbau von Lamin A, B und C und deren Modifikationen.

M: Phosphorylierungsstelle in vivo für die mitotische Kinase p34cdc2,

C: Phosphorylierungsstelle für Proteinkinase C,

NLS: Kernlokalisierungssignal aus 6-7 Aminosäuren,

CaaX: CaaX-Box-Motiv für die Isoprenylierung,

P1 und P2 markieren die Orte der proteolytischen Spaltungen

Erst die Modifikation der Aminosäuren CSIM, einer **CaaX-Box-Sequenz** (B-Typ Lamine CAIM), durch einen Farnesylrest erzeugt ein Membrantargeting (Sinensky et al., 1994b). Dieser hat so nach dem Transport in das Nukleoplasma dank seiner hydrophoben Eigenschaften eine besondere Affinität zur inneren Kernmembran (**Membrantargeting**) (Chelsky et al., 1987; Wolda und Glomset, 1988; Farnsworth et al., 1991; Chelsky et al., 1989 Sinensky et al., 1994a, 1994b; Beck et al., 1990, Farnsworth et al., 1989; Firmbach-Kraft und Stick, 1993; Übersicht in Moir et al., 1995), wie sie schon für das zytoplasmatische ras-Protein beschrieben ist (Willumsen et al., 1984, Hancock et al., 1989; Hancock et al., 1991). Die Aminosäuren SIM (bzw. AIM) werden proteolytisch entfernt (Abb.1.5, P1) und das Cystein carboxymethyliert (Sinensky et al., 1994a, 1994b). Nach der Assoziation mit der Kernmembran und dem Einbau in die Kernhülle wird diese Targetsequenz bei Lamin A ebenfalls proteolytisch abgespalten (Abb.1.5, P2)(Pugh et al., 1997; Sasseville und Raymond, 1995; Horton et al., 1992). Daneben ist diese Modifikation auch noch Voraussetzung für die Prozessierung des Prälamins A (Sinensky et

al., 1994a, 1994b; Hancock et al., 1991; Weber et al., 1989; Willumsen et al., 1984; Beck et al., 1990).

Für ein dauerhaftes Zurückhalten (**Retention**) des Proteins an der Kernperipherie ist dieses Signal allein allerdings zu schwach (Übersicht Towler et al., 1988, Raju et al., 1997). Eine stabile Integration erfolgt durch direkte Interaktion der Lamine miteinander und kann über eine Hyperphosphorylierung bestimmter Serinreste wieder aufgelöst werden (Aebi et al., 1986; Foisner, 1997; Gerace und Foisner, 1994; Peter et al., 1991; Ottaviano und Gerace, 1985).

Lamin A und C werden stets erst in eine schon existierende Lamina aus B-Laminen eingebaut (Dyer et al., 1997) und in der Regel erst mit der Ausdifferenzierung einer Zelle überhaupt nachweisbar.

Das ubiquitäre **Lamin B1** ist 587 Aminosäuren lang und besitzt ein Mr von 66.000 (Höger et al., 1988). Die mRNA hat eine Länge von 2.9kb. Es ist mit dem inneren Kernmembran über die farnesylierte CaaX-Box (Mical und Monteiro, 1998; Wolda und Glomset, 1988; Farnsworth et al., 1989; McKeon, 1991; Georgatos und Blobel, 1987) dauerhaft assoziiert, da sie nicht wie bei Lamin A später abgespalten wird. Es ist es in der Lage, andere Lamine, Chromatin sowie LAPs2 zu binden (Foisner und Gerace, 1993; Furukawa und Kondo, 1998).

Daneben gibt es noch **Lamin B2** (3.5kb), das zwar mit Lamin B1 eine hohe Übereinstimmung (72% identisch, Höger et al., 1990) besitzt, aber von einem anderen Gen exprimiert wird (Vorbürger et al., 1989; Heitlinger et al., 1991). Sein Mr beträgt 67.000.

1.3.3.3 Mitose-abhängige Modifikationen der Lamine

Der Anfang und das Ende der zentralen Domäne (33 bzw. 32 Aminosäuren) sind wie bei anderen Intermediärfilamenten hoch konserviert (Geisler und Weber, 1981, 1982). Im Abstand von 5 Aminosäuren befinden sich zu beiden Seiten dieser zentralen Domäne ebenfalls hochkonservierte SP/TP-Motive, deren konservierte Serine (Lamin A: Ser22 und Ser392) (Heald und McKeon, 1990; Höger et al., 1988; Loewinger und McKeon, 1988) bei Auflösung der Kernhülle in der Mitose phosphoryliert werden. Diese **Hyperphosphorylierung** der Lamine ist essentiell für die Auflösung der Kernhülle während der Mitose (Heald und McKeon, 1990; Gerace und Blobel, 1980; Haas und Jost, 1993; Ottaviano und Gerace, 1985; Peter et al.,

1990, Ward und Kirschner, 1990, Dessev et al., 1991), wobei der aminoterminal gelegene Serinrest 22 (Ser 22) entscheidend ist. Eine Mutation der carboxyterminale Phosphorylierungsstelle beeinträchtigt die Auflösung der Kernhülle minimal (Heald und McKeon, 1990; Lourim und Krohne, 1994). *In vitro* Studien zeigten, daß diese Serine ein Substrat für die mitotische p34cdc2 Proteinkinase darstellen (Dessev et al., 1991). Insgesamt nimmt der Phosphorylierungsgrad der Lamine in der Mitose gegenüber der Interphase um das 4-7-fache zu (Ottaviano und Gerace, 1985).

Während der Mitose gehen die A-Typ-Lamine in eine lösliche Form über wohingegen die B-Typ-Lamine an den verbleibenden Membranvesikeln verankert bleiben (Übersicht in McKeon, 1991, Nigg, 1992). Die **Depolymerisierung** in der Mitose erfordert ein Serin im N-Terminus (Ser 16 in B-Typ-Laminen, Ser 22 bei A-Typ-Laminen). Am C-terminalen Ende der Stabdomäne befinden sich weitere drei Serinreste als Phosphorylierungsstellen, die, gegen Alanin ausgetauscht, die Depolymerisation beeinträchtigen können (Heald und McKeon, 1990, Haas und Jost, 1993).

1.3.3.3.1 Ursprung der Lamine und ihre Bedeutung

Die hohe Übereinstimmung in der Struktur der A- und B-Lamine, nicht aber ihrer Aminosäuresequenz, könnte darin begründet liegen, daß die A-Typ Lamine sich aus den B-Typ Laminen weiterentwickelt haben (Stick, 1992; Peter et al., 1989), um spezielle Aufgaben zu übernehmen. Denn daß A-Typ Lamine eine essentielle Funktion besitzen müssen, zeigen Erkrankungen wie die autosomal dominante Emery-Dreifuss Muskeldystrophy beim Menschen (Bonne und Di Barletta, 1999, Sullivan et al., 1999). Ebenso findet sich eine Missense Mutation im globulären C-Terminus von Lamin A/C bei Betroffenen der partiellen Lipodystrophy (Dunnigan-Variante)(Speckman et al., 2000)

1.3.3.4 Meiosespezifische Lamine

1993 haben Vester et al. gezeigt, daß auch meiotische Zellen eine Kernlamina besitzen. Die Kernhülle in Spermatozyten der Ratte unterscheidet sich allerdings von der somatischer Zellen schon allein durch ihre deutlich geringere mechanische Stabilität, die möglicherweise darin begründet liegt, daß Lamine in geringeren

Mengen in Pachytänspermatozyten vorkommen (Vester et al., 1993; Alsheimer et al., 1999).

Nachweisen lassen sich in der Lamina von Pachytänspermatozyten von Nagetieren nur Lamin B1, meiosespezifisches Lamin B3 (Furukawa und Hotta, 1993), eine Splicingvariante von Lamin B2 (Vorbürger et al., 1989), sowie meiosespezifisches Lamin C2 (Smith und Benavente, 1992; Furukawa et al., 1994), eine Splicingvariante des Lamin A-Gens (Lin und Worman, 1993).

1.3.3.4.1 Lamin C2

Lamin C2 wurde 1992 von Smith und Benavente entdeckt. Furukawa et al. publizierten 1994 die Identifikation und Klonierung der keimzellspezifischen mRNA dieses A-Typ Lamins aus Maus. Die Identität von Lamin C2 zwischen Ratte und Maus beträgt immerhin 98,9%. Abweichungen finden sich nur im C-Terminus. Die Länge der mRNA beträgt 1,6 kb (Lamin A 3,1 kb und Lamin C 2,0 kb).

Die hochkonservierten N-terminalen 32 Aminosäuren der Stabdomäne (Nakajima und Abe, 1994), die in Coil 1A und einem Teil von Coil 1B von somatischen Laminen enthalten sind, fehlen in Lamin C2. Aus Polymerisierungs- und Phosphorylierungsstudien an Lamin A und C (Haas und Jost, 1993; Heald und McKeon, 1990) ist bekannt, daß beide hochkonservierten Randbereiche der Stabdomäne (Geisler et al., 1981, 1982) - das C-terminale Ende enthält 33 hochkonservierte Aminosäuren - für die posttranslationelle Dimerisierung der Lamine verantwortlich sind. Eine lineare Polymerisation, wie sie für andere Lamine nachgewiesen wurde (Gieffer und Krohne, 1991; Moir et al., 1991, 1995; Übersicht in Stuurman et al. 1998; Übersicht in Krohne, 1998.), scheint darum bei Lamin C2 nicht möglich.

Der meiosespezifischen Variante Lamin C2 fehlt gegenüber Lamin C ein Teil des N-Terminus (siehe 1.3.2.). Es fehlt dadurch mit Serin 22 die essentielle Phosphorylierungsstelle, die bei der Auflösung der Kernhülle in der Mitose die entscheidend ist (Heald und McKeon, 1990; Haas und Jost, 1993). Weitere in Lamin A/C nachgewiesene Phosphorylierungsstellen, die die Stabdomäne von beiden Seiten umgeben, sind vorhanden und werden zellzyklusabhängig phosphoryliert bzw. dephosphoryliert, sind aber nicht essentiell für die Auflösung der Kernlamina (Ottaviano und Gerace, 1985; Ward und Kirschner, 1990).

Eine Sequenzierung von Lamin C2 ergab, daß der fehlende Abschnitt am N-Terminus durch ein neuartiges **Hexapeptid** (GNAEGR) ersetzt ist (Nakajima und Abe, 1995), das zwischen Maus und Ratte konserviert ist. Diese Sequenz (GNAEGR) wird nicht von Exon 1, sondern von einer Sequenz kodiert, die zuvor als Teil von Intron 1 galt (Nakajima und Abe, 1995; Alsheimer und Benavente, 1996). Unbekannt ist bisher, ob Lamin C2 überhaupt Homo- und/oder Heterodimere bildet, wie es für Lamin A gezeigt wurde (Übersicht in Stuurman et al., 1998), zumal die Lamine A, C und B2 (vergleiche Furukawa und Hotta, 1993) in vivo nicht als Bindungspartner vorhanden sind. Lamin C2 sollte nach bisherigem Wissensstand als A-Typ Lamin nur mit Lamin B1 oder LAP1 (Martin et al., 1995) eine Bindung eingehen können.

1.3.3.4.2 Lamin B3

Aus Pachytänspermatozyten der Maus wurde 1993 von Furukawa und Hotta die cDNA eines 53 kDa Proteins gewonnen, die sich als die kleine Splicingvariante von Lamin B2 entpuppte. Am N-Terminus ist das nicht α -helikale Ende und ein Teil der helikalen Stabdomäne durch eine unbekannte kürzere Sequenz aus 84 Aminosäuren ersetzt (Furukawa und Hotta, 1993). Das bedeutet, daß die mRNA von Lamin B3 nur 1.8 kb lang ist und die 3'-untranslatierte Region (~ 1.5 kb) sowie die Exons 1-4 von Lamin B2 nicht enthalten sind. Diese neue Sequenz enthält Prolinreste und macht damit die Bildung eines coils unmöglich, da die plane Struktur des Prolins α -helikale Strukturen stört. Damit besitzt Lamin B3 eine ungewöhnlich lange nicht α -helikale Domäne und die kürzeste zentrale Stabdomäne aller Lamine.

Exprimiert in somatischen Zellen deformiert das eingebaute Lamin B3 zwar die Kernhülle, aber die Vitalität der Zellen scheint unbeeinträchtigt (Furukawa und Hotta, 1993). Lamin B3-Mutanten mit Deletionen im N-Terminus zeigten, daß die hakenförmige Deformation des Zellkern in somatischen Zellen einzig durch den neuartigen N-Terminus, nicht durch die Deletionen des N-Terminus von Lamin B2 verursacht wird (Furukawa und Hotta, 1993).

Den meiosespezifischen Varianten gemeinsam ist das Fehlen des nicht helikalen N-terminus sowie eines Teils der helikalen Stabdomäne, dem coil 1A, die in A-Typ und B-Typ Laminen hochkonserviert ist. Dadurch fehlt die für die Depolymerisation der

Kernhülle in der Mitose essentielle Phosphorylierungsstelle Ser22 (A-Typ Lamine) bzw. Ser16 (B-Typ Lamine) und der N-terminale konservierte Bereich, der in die Dimerisierung und Polymerisierung involviert ist (Haas und Jost 1993; Heald und McKeon, 1990).

1.4 Der Synaptonemalkomplex

Als das wohl markanteste Phänomen in einer meiotischen Zelle ist die Ausbildung des Synaptonemalkomplexes anzusehen. Es handelt sich dabei um ein Proteingerüst, in das die gepaarten homologen Chromosomen integriert sind. Erkennbar sind neben nach außen ragenden Chromatinschleifen ein Zentralelement sowie zwei Lateralelemente. Erste Zeichen für die Entstehung eines Synaptonemalkomplexes sind die punktuellen Materialanreicherung, entlang der Chromosomenachsen im Zygotän. Diese verschmelzen im Verlauf des Zygotäns entlang der Chromosomenachsen zu Lateralelementen. Erst danach kommt es zur eigentlichen Synapse der beiden homologen Chromosomen (Beschreibung siehe 1.2.1)

Elektronenmikroskopische Untersuchungen (Smith und Benavente, 1992, Offenberger et al., 1998) und indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigen folgende Verteilung der bisher bekannten Proteine SCP1/SYN1, SCP2, SCP3/COR1 und SC48, die in Abb. 1.6 zusammengefaßt sind:

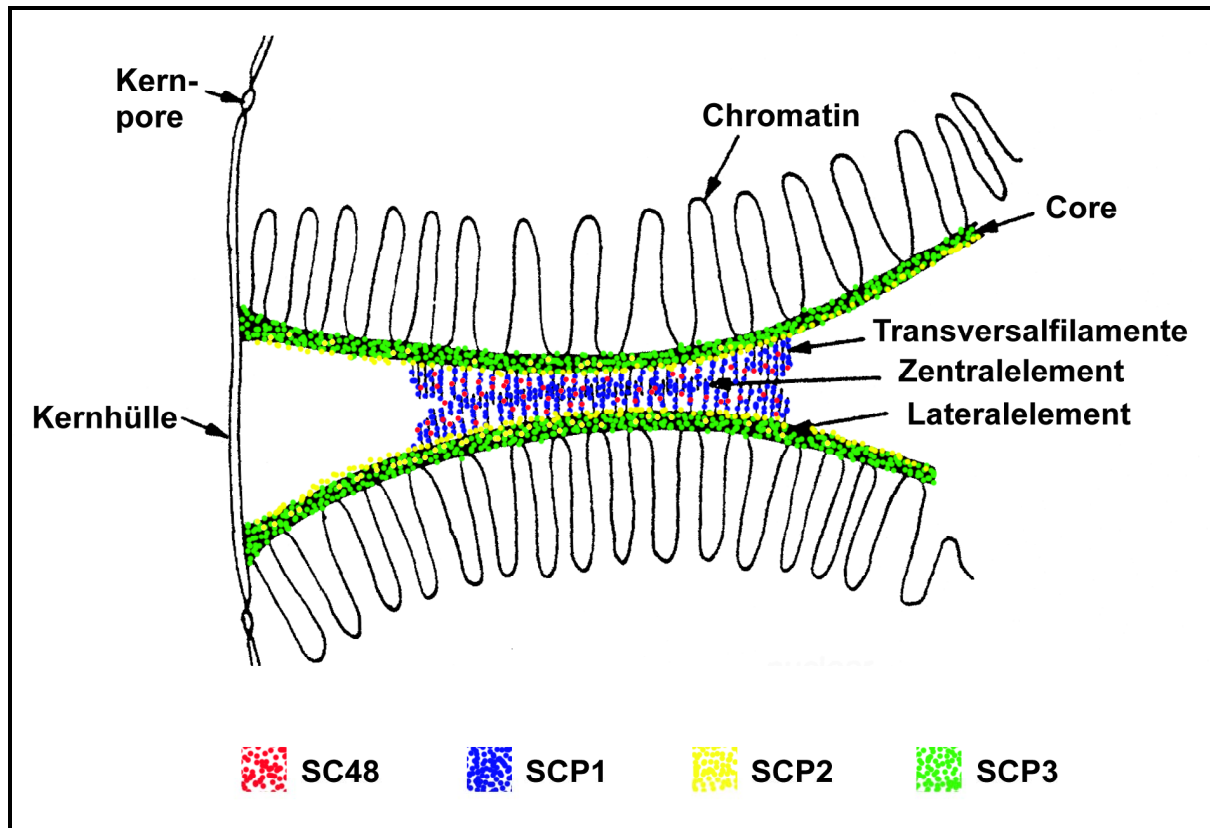


Abb.1.6: Schematische Darstellung eines Synaptonemalkomplexes (nach Moens, 1993, verändert) und Lokalisation der SC-Proteine

1.4.1 Die Proteine des Synaptonemalkomplexes

SCP1 (SYN1 beim Hamster) ist ein Protein mit 120 kDa und wurde in den transversalen Fasern des Synaptonemalkomplexes lokalisiert. Die C-terminalen Enden zeigen jeweils Richtung Lateralelemente und die N-terminalen Enden überlappen und scheinen so das Zentralelement zu bilden (Meuwissen et al., 1997; Liu et al., 1996, Schmekel et al., 1996). SCP1 benötigt für seine Organisation im SC SCP3 (Yuan et al, 2000).

SCP2 ist ein Protein mit 170 kDa und wurde hauptsächlich auf der den transversalen Fasern zugewandten Seite der Lateralelemente lokalisiert (Offenberg et al., 1998; siehe Abb. 1.6).

SCP3 (COR1 beim Hamster), das eine zentrale α -helikale Stabdomäne besitzt, ist ein Bestandteil der Lateralelemente (Liu et al, 1996). SCP3 ist schon früh in der Prophase I nachweisbar und verschwindet erst nach der Metaphase I (Tarsounas et al., 1997, 1999). Das Protein kommt in der Prophase I in mindestens 24 Phosphorylierungszuständen (Lammers et al., 1995) vor, wobei in Western Blots die

Banden bei 30 und 33 kDa deutlich überwiegen (siehe auch Ergebnisse, Abb.4.9). *In vitro* Untersuchungen zeigten, daß SCP3 in der Lage ist, bündelartige Strukturen (Yuan et al., 1998) zu bilden, und sich ähnlich Intermediärfilamentproteinen zu verhalten. Bei einer homozygoten Nullmutation von SCP3 sind männlichen Ratten steril, da während der meiotischen Prophase massiver apoptotischer Zelltod eintritt (Yuan et al., 2000). Die Bildung der Axial- und Lateralelemente, der SCs und die Synapse der Chromosomen unterbleibt. Die Verteilung von DNA-Reparaturproteinen und Rekombinationsproteinen wie Rad51 und RPA im Zellkern ist ebenfalls gestört. Die Chromatinorganisation bleibt rudimentär.

Im Bereich des Zentralelements wurde außerdem noch ein Protein SC48 (Smith und Benavente, 1992b), Mr 48.000 nachgewiesen. DNA ist im Bereich des Zentralelements nur vereinzelt nachgewiesen (Vázquez-Nin et al., 1993). Bisher kann über die Interaktionen und die Funktion der einzelnen Bestandteile nur spekuliert werden.

1.4.2 Attachment Plaques

Im Übergangsbereich der SC-Enden und der Kernhülle zeigen sich oft besonders dichte und verdickte Strukturen, die sogenannten Attachment Plaques (siehe Abb.1.7; Heyting et al., 1985, 1987; Dresser et al., 1987; Page et al., 1998; Übersicht in Zickler und Kleckner, 1999), deren Zusammensetzung und Funktion noch nicht geklärt ist.

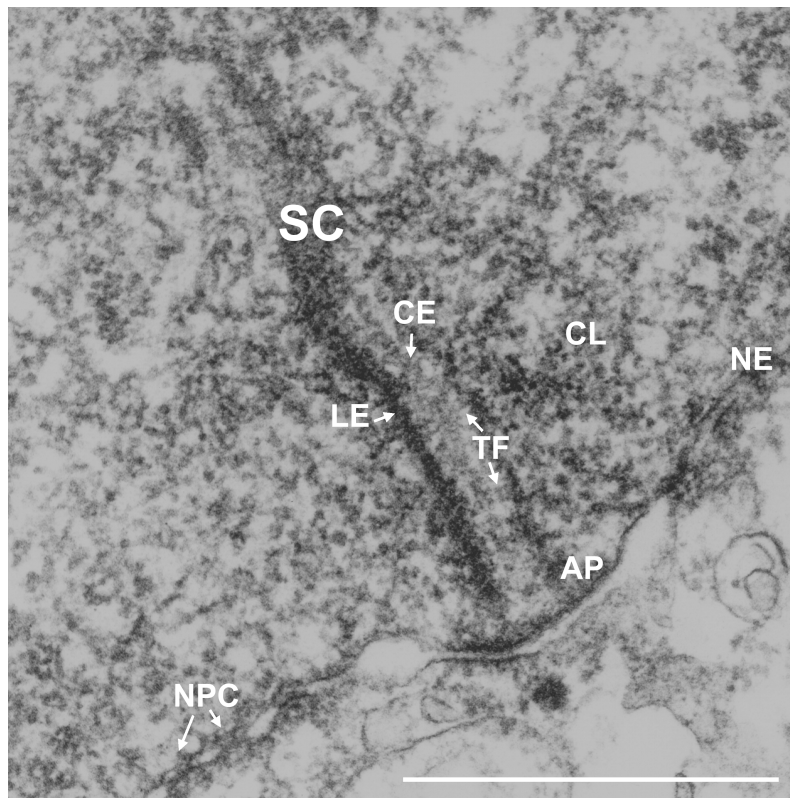


Abb.1.7: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Synaptonemalkomplexes (SC) in Pachytänspermatozyten der Ratte. CE: Zentralelement, LE: Lateralelement, TF: Transversalfasern, AP (attachment plaques): Anheftungsstelle der SCs, NE: Kernhülle, NPC: Kernporenkomplex. Balken entspricht 1μm

1.4.3 Mögliche Funktion des Synaptonemalkomplexes

Die Funktion des SC konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Diskutiert werden eine Beteiligung an der Initiierung der Paarung der homologen Chromosomen, die wiederum mit einer neuen Chromatinorganisation korreliert (Dawe et al., 1994; Moens et al., 1998; Moens und Pearlman, 1990). Die schleifenförmige Anordnung des Chromatin scheint in Beziehung zur Chromosomenorganisation zu stehen, da z.B. Telomersequenzen bevorzugt nahe dem Proteingerüst zu finden sind (Heng et al., 1996). Daneben konnten Pearlman et al. 1992 zeigen, daß die mit den SCs assoziierte DNA eine hohe Übereinstimmung mit den sogenannten "long" und "short" interspersed repeated elements (LINE/SINE), zahlreiche GT/CA-Tandem-Repeats und einige unbekannte Sequenzen besitzt. Weitere Aspekte sind die meiosespezifische Chromosomenbewegung in der Prophase (Parvinen und Söderstrom, 1976) sowie die Rekombination (Übersicht in Ashley, 1994, Plug et al., 1998) und die sogenannten frühen und späten Rekombinationsknoten. Zahlreiche Proteinen, z.T. auch deren meiosespezifischen Varianten, konnte mittlerweile eine Interaktion mit dem Chromatin und oder dem SC nachgewiesen werden: z.B. Rad51 (Plug et al., 1998), ATM (Plug et al., 1998), BLM (Moens et al., 2000), deren Mutationen zu schweren Störungen in der Meiose führen.

2. Ziel der Arbeit

Im Verlauf der Meiose in Eukaryonten kommt es zu dramatischen Umstrukturierungen der Chromosomen und der Kernhülle. Da die Chromosomen während dieser Zeit über die Telomere an die Kernhülle geheftet sind und diese dennoch umfangreiche Wanderbewegungen innerhalb der Kernhülle vollführen, stellt sich deshalb die Frage nach der besonderen Organisation der Kernhülle. Verglichen mit somatischen Zellen besitzen meiotische Zellen eine deutlich geringere Stabilität und die Zusammensetzung der Kernhülle weicht auffällig von der somatischer Zellen ab.

In Spermatozyten von Säugetieren sind die Lamine A/C und B2 durch meiosespezifische Splicingvarianten ersetzt, denen für die Aggregation der Kernlamina in einer somatischen Zelle essentielle Proteinsequenzen im Bereich des Aminoterminus fehlen. Ersetzt sind diese durch kürzere und neuartige Abschnitte, deren Funktion unbekannt ist.

Mit dieser Arbeit soll nun ein Beitrag zum Verständnis der Funktion von Lamin C2 geleistet werden, das als einziges A-Typ Lamin während der meiotischen Prophase I nachgewiesen werden kann. Eine Lokalisation innerhalb der Kernhülle von Spermatozyten sowie mögliche zeitliche und lokale Korrelationen mit anderen Komponenten der Kernhülle und den SCs werden zuerst näher betrachtet. Da es bisher aus technischen Beschränkungen nicht möglich ist, die Entwicklung von Spermatozyten in vivo oder isoliert in Kultur über Tage zu beobachten, soll eine Kurzzeitkultur mit künstlich verkürzter Prophase I eine Untersuchung von Lamin C2 beim Übergang zur Metaphase I ermöglichen. Weitere Kernhüllenkomponenten dienen dabei als Referenz für die Integrität der Kernhülle. Abschließend soll der Membrantargetingmechanismus von Lamin C2 aufgeklärt werden, da diesem Lamin eine CaaX-Box fehlt. Zu diesem Zweck soll die Rolle des für Lamine neuartigen Hexapeptids durch Transfektionen in somatischen Zellen untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antibiotika

Ampicillin (50mg/ml), Endkonz. 50µg/ml
 Kanamycin (25mg/ml), Endkonz. 50µg/ml
 Penicillin/Streptomycin (Gibco BRL)

3.1.2 Antikörper

3.1.2.1 Primärantikörper

	Herkunft	Antigen (in meiotischen Zellen)	Verdünnung	Fixierung	Literatur
13d4	mAk Maus (IgM)	LAPs2	IF: 1:10 Blot: 1:10	MeOH/Aceton 1% PFA/0.05% Triton X-100	Alsheimer et al., 1998
MAN	polyklon. Serum aus Mensch (IgG)	LAPs2	IF: 1:500 Blot: 1:5000	1% PFA/0.05% Triton X-100	Paulin-Levasseur et al., 1996; Lang et al., 1999)
pkB8	mAk Maus (IgM)	Lamin B1	IF: 1:10 Blot: 1:100	MeOH/Aceton 1% PFA/0.05 % Triton X-100	Krohne et al., 1984
R27	mAk Maus (IgM)	Lamin C2	unverdünnt	MeOH/Aceton 1% PFA/0.05 % Triton X-100	Höger et al., 1991; Smith und Benavente 1992
α-SCP3	polyklon. Serum aus Meer-schweinchen (IgG)	SCP3 (nur, wenn nicht denaturiert!)	IF: 1:25 Blot: 1:250	MeOH/Aceton 1% PFA/0.05 % Triton X-100	Alsheimer und Benavente 1996
α-DNA	polyklon. Antikörper aus Mensch (IgG)	DNA	IF: 1:100	1% PFA/0.05% Triton X-100	Kallestad, Chaska, MN, USA

3.1.2.2 Sekundärantikörper

Soweit nicht anders angegeben stammen die Antikörper von Dianova, Hamburg:

3.1.2.2.1 Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper

Texas-Red- α -Maus IgM+IgG

Texas-Red- α -Mensch IgG

Texas-Red- α -Ratte IgG

DTAF (Dichlorotriazinylaminofluorescein) - α -Maus IgM

DTAF- α -Meerschweinchen IgG

DTAF- α -Mensch IgG

Cy2 (Indocarbocyan) - α -Mensch IgG

Cy3- α -Maus IgM

3.1.2.2.2 Peroxidase-gekoppelte Antikörper

Peroxidase- α -Maus IgM+IgG

Peroxidase- α -Meerschweinchen IgG

3.1.2.3 DNA-spezifisches Fluorochrom

Hoechst 33258 (Hoechst, Frankfurt)

3.1.3 Bakterienstämme

XL-1 Blue MRF' (Stratagene, Heidelberg)

3.1.4 Chemikalien

Aceton (Roth, Karlsruhe)

Acrylamid (Roth, Karlsruhe)

Agar agar (Ferak, Berlin)

Agarose NEEO (Roth, Karlsruhe)

Ammoniumperoxosulphit (Roth, Karlsruhe)

Bacto-Trypton (Gibco BRL, Eggenstein)

Bromphenolblau (Roth, Karlsruhe)

BSA (Rinderserumalbumin Fraktion V, Sigma, Deisenhofen)

Calciumchlorid (Ferak, Berlin)
Cacodylat (Sigma, Deisenhofen)
Chloroform (AppliChem, Darmstadt)
3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB, Sigma)
1,4-Dithiothreitol (DTT, Roth, Karlsruhe)
DMP-30 (Dimethylaminomethylphenol, Katalysator) (Serva, Heidelberg)
2-Dodecenylsuccinylsäureanhydrid (DDSA) (Serva, Heidelberg)
EDTA ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$) p.a. (Roth, Karlsruhe)
Einbettmedium (Leica, Nußloch)
Essigsäure konz. (AppliChem, Darmstadt)
Ethanol vergällt (Roth, Karlsruhe)
Ethanol p.a. (Roth, Karlsruhe)
FCS (fötales Kälberserum, Gibco)
Glutaraldehyd (Sigma, Deisenhofen)
Glycidether (Serva, Heidelberg)
Glycerin 100% (Roth, Karlsruhe)
Glycin p.a. (Roth, Karlsruhe)
D(+)-Glucose-Monohydrat (Ferak, Berlin)
L-Glutamin (200mM) (GIBCO BRL, Eggenstein)
Glutaraldehyd (Roth, Karlsruhe)
Harnstoff (AppliChem, Darmstadt)
HEPES (Roth, Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat (Ferak, Berlin)
Lipofectamin (GIBCO BRL, Eggenstein)
 β -Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe)
Methanol (Roth, Karlsruhe)
Methyl-bis-acrylamid (Roth, Karlsruhe)
2-Methylbutan (Roth, Karlsruhe)
Methylnadylanhydrid (Serva, Heidelberg)
Milchpulver (sprühgetrocknet, Farmland, Buttenheim)
Mowiol 40-88 (Sigma, Deisenhofen)
Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe)
di-Natriumhydrogenphosphat (AppliChem, Darmstadt)
Natriumhydroxid (Ferak, Berlin)

NDA (Kodak, USA)
DL-Norleucin (Sigma, Deisenhofen)
Okadasäure, freie Säure (ICN, Eschwege)
Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt)
Poly-L-Lysin (Sigma, Deisenhofen)
Ponceau S concentrate (Sigma, Deisenhofen)
1,2-Propylenoxid (AppliChem, Darmstadt)
Salzsäure 37% (AppliChem, Darmstadt)
2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (Serva, Heidelberg)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Roth, Karlsruhe)
Triton X-100 (Roth, Karlsruhe)
Trypsin Inhibitor SI (Roth, Karlsruhe)
Tween 20 (Roth, Karlsruhe)
yeast extract (Gibco BRL, Eggenstein)
Wasserstoffperoxid 30% (AppliChem, Darmstadt)

3.1.5 Enzyme

3.1.5.1 Restriktionsenzyme

Alle Enzyme stammen von der Firma MBI Fermentas aus St. Roth:

BamHI

EcoRI

XhoI

3.1.5.2 übrige Enzyme

Collagenase (Sigma, Deisenhofen)
DNaseI (Boehringer, Mannheim)
T4-DNA-Ligase (Stratagene, Heidelberg)
Trypsin 2,5% (Gibco BRL, Eggenstein)

3.1.6 Fotomaterial

für Elektronenmikroskopische Aufnahmen: Planfilme Agfa SCIENTIA EM-Planfilm (Plano, Marburg), EM-Negativentwickler Kodak-D19 (Kodak), Tetanal Schnellfixierbad (Tetenal Fixiersalz, Tetenal Fotowerk, Norderstedt)

für Immunfluoreszenzen: Ilford HP-5 Plus 400, Zweikomponentenentwickler Diafine (Fa. Amfine, Chicago Illinois, USA), Fixierbad Tetenal

für Positivabzüge: Fotopapier Härte 3-5 (Brovira Speed, Agfa, Leverkusen), Neutol Positiventwickler (Agfa), Positiv-Fixierbad (Tetenal Fixiersalz, Agfa)

3.1.7 Geräte

Agarose-Gelkammer, klein

Begasungsbrutschrank, CO₂-Auto-Zero (Heraeus, Hanau)

Blotkammer (Graphit, Biorad)

Cytospin (Cytospin 2, Shandon, Frankfurt/M)

Elutriator (Zentrifuge:J2-21M/E (Beckmann, München)

mit Rotor:JE-63 (Beckmann, München)

und Peristaltik-Pumpe (Masterflex, München))

Eppendorf-Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg)

Feinwaage (Mettler AC100, Gießen)

Fluoreszenzmikroskop Zeiss-Axiophot Stereo mit HBO 50 Quecksilberlampe (Zeiss, Oberkochen)

Gefriermikrotom, 2800 Frigocut E (Reichert-Jung, Nußloch)

Gewebekulturschalen 3 cm, 6 cm und 10 cm (Greiner, Labortechnik)

Graphit-Blotkammer (LMS, bezogen über Hartenstein, Würzburg)

Heizplatte mit Magnetrührer (Bachhofer, Reutlingen)

Labormikroskop Leitz Laborlux S (Leitz, München)

Laborwaage (Mettler, Gießen)

Konfokales Laser Scanning Mikroskop TCS-NT (Leica, Bensheim)

Kühlzentrifuge Sorvall RC-5b (Du Pont, Bad Homburg)

Magnetrührer

Mikrotom 2800 Frigocut E (Reichert-Jung, Heidelberg)

Netzgeräte, stabilisiert (Dipl.Ing. L. Fischer, Heidelberg, bzw. Gibco BRL, Eggenstein)

PCR-Cycler Progene (Techne, Cambridge, GB)

pH-Meter

Photometer Uvikon 710 (LKB, München)

Röntgenfilme (Sterling, Newark, USA)

Schüttler

Schwarzweiß Negativfilme Ilford HP5 Plus 400

SDS-Page-Gelkammer (Biorad, München)

Sterilbank Steril Cord Hood (Baker, Sanford, Maine)

Transmissionselektronenmikroskop EM 900 (Zeiss, Jena)

Ultramikrotom Om U2 (Reichert, Wien, Österreich)

Ultrazentrifuge L 8-70 (Beckmann, München)

UV-Lampe

Vergrößerungsapparat (Focomat, Durst, Brixen)

Vortex Genie 2 (Leitz, Wetzlar)

Wasseraufbereitungsanlage: Milli-Q^{UF} Plus (Millipore, Eschborn)

Wasserbad (Hartenstein, Würzburg)

Zentrifuge (Minifuge T, Heraeus, Hanau)

3.1.8 Kits

ECL-Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg)

PCR-Script Amp Cloning Kit (Stratagene, Heidelberg)

Qiagen Plasmid Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)

Qiagen Plasmid Midiprep Kit (Qiagen, Hilden)

Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)

3.1.9 Marker

DNA-Marker: Goldpeq DNA-sizer III (PeqLab, Erlangen)

Proteinmarker: high und low Range (Biorad, München)

3.1.10 Medien

α -DMEM (Gibco BRL, Eggenstein)

DMEM (Gibco BRL, Eggenstein)

OptiMEM (Gibco BRL, Eggenstein)

3.1.11 Primer

5'- GCT CTC TCT GGC CCA GCC ATG GGG AAC GCT GAG GGC CGC A -3'

5'- TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG -3' (T7-Primer)

3.1.12 Software

Verwendete Betriebssysteme und Programme: Windows NT, Word 7.0, Netscape 4.5 und Adobe Photoshop 3.0 (Adobe Systems, San Jose, CA)

3.1.13 Vektoren

pcDNA3 (invitrogen, Groningen, Niederlande)

pPCR-Script SK(+) (Stratagene, Heidelberg)

pBluescript SK (+) (Stratagene, Heidelberg)

pEGFP-N2 (Clontech, Heidelberg)

3.1.14 Versuchstiere

Wistar-Ratten, männl., 35-38 oder 39-42Tage (Charles River, Sulzfeld)

3.1.15 Zelllinien

COS7-Zellen (Affennierenzellen)

RV-SMC-Zellen (epitheliale Zellen aus adulten Rattenvenen, Franke et al. 1980)

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung von Gefrierschnitten für indirekte Immunfluoreszenz

Frisch entnommenes Hodengewebe wird in mit flüssigem Stickstoff auf -160°C heruntergekühltem 2-Methylbutan schockgefroren und in 2-Methylbutan bei -70°C gelagert. Nach zwei Tagen werden $6\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte davon am Gefriermikrotom hergestellt und auf einen Objektträger übertragen. Nach kurzem Antrocknen an der Luft werden die Schnitte fünf Minuten in Aceton (-20°C) fixiert und erneut luftgetrocknet.

3.2.2 Immunlokalisation

Nach der Fixierung wird der Primärantikörper auf die Präparate aufgetropft und in einer feuchten Kammer 20-40 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für je fünf Minuten wird der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Sekundärantikörper für 10-20 Minuten auf die Präparate aufgebracht. Zum Sichtbarmachen der DNA wird diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 gegengefärbt. Nach erneutem Waschen für dreimal fünf Minuten werden die Präparate zwei Minuten in 100%igem Ethanol p.a. getrocknet. Anschließend werden sie in Mowiol (3g Mowiol 40-88, 40ml PBS (4g NaCl, 0.63g Na_2HPO_4 , 0.1g KCl auf 500 ml, mit KH_2PO_4 auf pH8.0 einstellen), 20ml Glycerin) eingebettet und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Auswertung erfolgt am Fluoreszenzmikroskop.

3.2.3 Versuche mit Pachytänspermatozyten

3.2.3.1 Gewinnung von Pachytänspermatozyten aus Rattenhoden mittels zentrifugaler Elutriation nach Meistrich 1977 modifiziert nach Heyting und Dietrich 1991:

Es werden folgende Lösungen am Vortag vorbereitet:

- | | |
|----------------|---------------------------------|
| 1. 5 Liter PBS | 140mM NaCl |
| | 2.6mM KCl |
| | 6.4mM Na_2HPO_4 |
| | 1.4mM KH_2PO_4 |
| | pH7.2-7.4 |

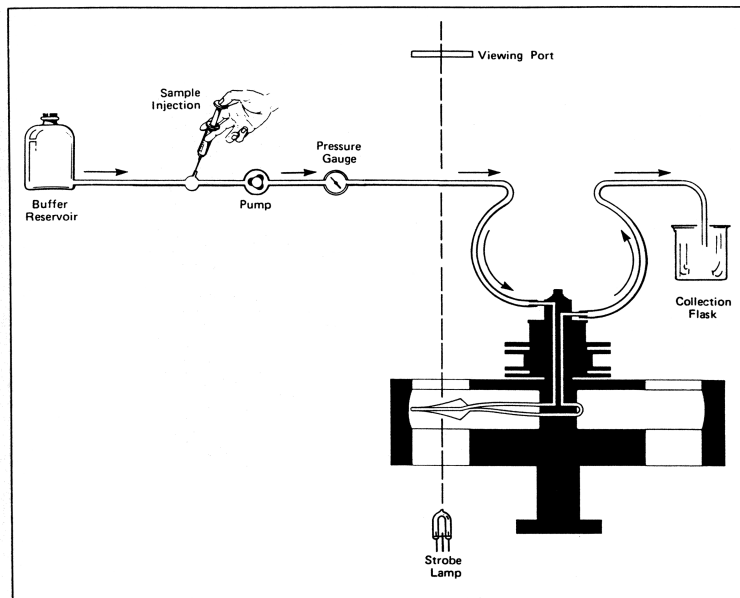
2. 4 Liter DPBS	4l PBS 0.01% $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01% $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	
3 Liter Elutriationspuffer	3l DPBS 0.5% BSA	
4. Verdau-Lösung	100ml DPBS/5 Ratten 0.1% Glucose-Monohydrat 0.1% Trypsin 2µg/ml DNase I Collagenase	Spatelspitze (frisch dazugeben) Spatelspitze (frisch dazugeben)
5. NDA-Lösung	100ml DPBS/5 Ratten 0.2% NDA DNase I	Spatelspitze (frisch dazugeben)

Sämtliche Lösungen werden in Millipore-Wasser angesetzt und zum Entgasen bei 4°C über Nacht gelagert. Zum Spülen der Elutriationskammer werden weitere 3 Liter vorgekühltes Wasser benötigt.

Vor Arbeitsbeginn werden ein Wasserbad auf 31°C vorgeheizt und eine Heraeus-Zentrifuge sowie die Elutriationszentrifuge auf 4°C vorgekühlt. Die vorbereiteten Lösungen werden komplettiert.

Den mit Kohlendioxid getöteten Ratten (35-38 oder 39-42 Tage alt) werden die Hoden entnommen. Diese werden in eiskaltes DPBS gegeben und von der Tunica albuginea entfernt. Mit Rasierklingen wird das Gewebe sehr kleingeschnitten. Die entstandene Suspension wird mittels einer Spritze ohne Kanüle aufgenommen, über eine Kanüle (0.6µm Durchmesser) in 50ml Falconröhrchen überführt und in der Heraeus-Zentrifuge 5 Minuten bei 450xg und 4°C pelletiert. Das Pellet wird in komplettierter Verdauungslösung gut resuspendiert und 30 Minuten im 31°C Wasserbad und unter langsamen Rühren verdaut. Zum Neutralisieren des Trypsins werden 10ml FCS zugegeben und gut gemischt. Um größere Gewebereste zurückzuhalten, wird die Zellsuspension über ein Drahtnetz (300µm Maschenweite) gegeben. Die Zellen

werden erneut pelletiert wie oben beschrieben. Darauf folgt die Resuspension des Pellets in NDA-Puffer. Um nur Einzelzellen zu erhalten, wird diese Zellsuspension über ein mit DPBS eingeweichtes Nylonnetz (25-30µm Maschenweite) gegeben. Die Zellen werden bis zum Elutrieren unter Drehen bei 4°C gelagert.



Schematische Darstellung eines Elutriators (Zentrifuge: J2-21M/E (Beckmann, München) mit Rotor: JE-63 (Beckmann, München) und Peristaltik-Pumpe (Masterflex, München))

Die gesamte zentrifugale Elutriation wird bei 4°C durchgeführt: Sowohl der Elutriationspuffer als auch die Auffanggefäße aus Kunststoff werden auf Eis gestellt. Das gesamte System wird mit entgastem Wasser gespült und von Luftblasen befreit. Anschließend werden das tatsächliche Durchflußvolumen/Zeiteinheit mittels Meßzylinder und Stoppuhr bestimmt und die genauen Einstellungen der Pumpe berechnet.

Fraktion	rpm	ml/min	Einstellung	Zeit
1+2	3000	31.5		bis Blasenfalle klar
3	3000	41.5		4min
4+5	2000	28.5		5min
6	2000	40.0		4min

Die gekühlte Zellsuspension wird mit einer Fließgeschwindigkeit von 31.5 ml/min. und 3000 rpm durch die Blasenfalle in die Elutriationskammer gepumpt. Vor allem die Spermien verlassen die Kammer. Sobald der Elutriationspuffer in der Blasenfalle wieder klar ist, wird die Durchflußgeschwindigkeit auf 41.5 ml/min. erhöht. Dabei

werden vor allem runde Spermatiden aus der Kammer gespült (Fraktion 3) und in Zentrifugenflaschen aufgefangen, während die größeren Spermatozyten in der Kammer zurückgehalten werden. Die verbleibenden Spermatiden werden zusammen mit einem Teil der Spermatozyten bei 28.5 ml/min. und 2000 rpm aus der Elutriationskammer gespült (Fraktion 4/5). Fraktion 6 aus auf über 80% angereicherten Spermatozyten wird durch Erhöhung der Durchflußgeschwindigkeit auf 40.0 ml/min. gewonnen. Die Zeitangaben für die einzelnen Fraktionen ergeben die optimalste Ausbeute.

Die Zellen werden anschließend bei 1600rpm zehn Minuten in einer Kühlzentrifuge (Sorvall) bei 4°C abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes werden die Zellen vorsichtig dreimal mit kaltem PBS gewaschen und jeweils fünf Minuten bei 4°C und 450 x g abzentrifugiert. Um die Ausbeute zu bestimmen, wird die Zellzahl mit einer Rosenthal-Zählkammer bestimmt.

Die Zellen werden in Probenpuffer (1x) aufgenommen und direkt weiter verarbeitet bzw. bei -20°C eingefroren.

3.2.3.2 EM-Lokalisation von Laminen in der Kerhülle von Pachytänspermatozyten mittels 3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) (nach Graham und Karnovsky, 1966, verändert)

Wie unter 3.2.1 beschrieben mittels zentrifugaler Elutriation nach Meistrich 1977 werden Pachytänspermatozyten gewonnen.

Die Zellen werden mit Paraformaldehyd fixiert (1% PFA, zehn Minuten) und durch eine Extraktion mit Triton X-100 (0.05% Triton X-100/PBS, eine Minute) für Antikörper zugänglich gemacht.

Die Zellen werden zweimal fünf Minuten mit PBS gewaschen. In einer feuchten Kammer werden die Primärantikörper auf die Zellen appliziert und 40 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wird der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper (1:1000 in PBS) 40 Minuten inkubiert. Gründliches Waschen entfernt den unspezifisch gebundenen Sekundärantikörper aus den Zellen, die 30 Minuten mit 2.5% Glutaraldehyd fixiert werden. Die Zellen werden 50mM Cacodylatpuffer (pH 7.4) gewaschen und anschließend mit 50 mM Tris-Puffer (pH 7.4) inkubiert. Währenddessen werden 5mg 3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) in 10ml 50mM Tris-Puffer (pH 7.4) gelöst. Man gibt 5µl Wasserstoffperoxid zur

DAB-Lösung, mischt sorgfältig und gießt sie in eine 60mm Petrischale. Die Deckgläschen werden mit den Zellen nach oben in den DAB/H₂O₂-Ansatz getaucht und vollständig bedeckt. Je nach Antikörper verbleiben die Präparate 5-25 Minuten in der Petrischale. Es bildet sich ein gut sichtbarer brauner Niederschlag. Um die Reaktion abzustoppen, werden die Zellen in aqua bidest gewaschen. Zum endgültigen Fixieren der Kernmembran werden die Zellen in 1%-igem Osmiumtetroxid (4%-iges OsO₄ mit aqua bidest verdünnt) 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen mit aqua bidest werden die Präparate bis zur Einbettung in destilliertem Wasser aufbewahrt. Die Entwässerung erfolgt bei Raumtemperatur in kleinen Glasschälchen mit Abdeckung und benötigt 5 Minuten pro Schritt. Es werden Ethanolkonzentrationen von 50%, 70%, 90%, 96%, 100% und 100% eingesetzt. Daran schließen sich sofort zwei Inkubationen mit Propylenoxid an. Die feuchtgehaltenen Zellen werden möglichst schnell mit einem Epon/Propylenoxid-Gemisch (1:1) überschichtet und bis zum nächsten Morgen stehengelassen. Das sehr flüchtige Propylenoxid in den Zellen wird über Nacht durch Epon ersetzt.

<u>Glutaraldehyd (2.5%):</u>		2.5% Glutaraldehyd	
		50 mM Cacodylat pH7.2	
		50 mM KCl	
		2.5 mM MgCl ₂	
<u>Cacodylatpuffer(pH7.4):</u>		50 mM Cacodylat in Wasser	
<u>Osmiumtetroxyd:</u>		2% OsO ₄	
		50 mM Cacodylat pH7.2	
<u>Herstellung von Epon:</u>		Glycinether 100	
		Dodecenylsuccinylsäureanhydrid (DDSA)	
		Methylnadylanhydrid (MNA)	
		DMP-30 (Katalysator)	
Mischung	A:	DDSA	50.1 g
		Glycinether	37.2 g
	B:	MNA	54.25 g
		Glycinether	60.0 g

Beide Ansätze bei -70°C lagern. Zum Gebrauch zwei Stunden vorher auftauen und im Verhältnis 4(A) zu 3(B) und 1,5 Vol% DMP-30 unter langsamen Rühren mischen und bei 4°C bis zum Gebrauch lagern.

Das Epon wird am nächsten Morgen ausgetauscht. Zwei Stunden später werden epongefüllte Gelatinekapseln auf die Zellen gesetzt und so mindestens 24h im Ofen bei 60°C ausgehärtet.

Die Schnitte mit einer Dicke von 60-80nm werden am Transmissionselektronenmikroskop bei 10.000-20.000-facher Vergrößerung ausgewertet und bei 80kV fotografiert.

3.2.4 Zellkultur:

3.2.4.1 Medium

Kulturmedium für COS7-Zellen:	DMEM	440 ml
	10% FCS	50 ml
	1% L-Glutamin (200mM)	5 ml
	1% Pen./Strep.	5 ml

werden unter sterilen Bedingungen gemischt und 5ml als Probe davon wird über Nacht als Sterilitätskontrolle bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2.4.2 Transfektion von COS7-Zellen mit Hilfe von Lipofectamin

Am Vortag sind 5×10^5 Zellen in 60mm Petrischalen auf kleinen autoklavierten Deckgläschen ausgesät worden.

Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und in 3ml Transfektionsmedium OptiMEM (GIBCO BRL) inkubiert.

Pro Petrischale werden 2.5-5µg Plasmid-DNA mit OptiMEM auf 100µl auffüllt. Parallel werden 12µl Lipofectamin mit OptiMEM auf 100µl aufgefüllt. Beide Ansätze werden jeweils gut gemischt, dann miteinander gut mischen. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wird der Ansatz auf 1ml mit OptiMEM aufgefüllt. Von den Zellen wird das Transfektionsmedium abgenommen

und der Transfektionsansatz aufgebracht. Die Transfektion der Zellen erfolgt während einer zwei-stündigen Inkubationszeit im Brutschrank bei 37°C und 5%CO₂. Durch gründliches Waschen der Zellen mit PBS werden die Plasmid-Lipofectamin-Aggregate entfernt und die Zellen werden in normalem Kulturmedium über Nacht im Brutschrank unter normalen Bedingungen kultiviert. Nach 24, 48 und 72 Stunden erfolgt die Fixierung der Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie bzw. die Transmissionselektronenmikroskopie.

3.2.4.2.1 Fixierung der transfizierten Zellen für Immunfluoreszenz

Die transfizierten Zellen werden mit Methanol (-20°C) zehn Minuten und Aceton (-20°C) eine Minute fixiert. Nach dem Lufttrocknen bei Raumtemperatur wird eine indirekte Immunfluoreszenzlokalisierung wie unter 3.2.2 beschrieben durchgeführt. Die Auswertung erfolgt mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie.

3.2.4.2.1 Auswertung der transfizierten Zellen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop

Die Immunfluoreszenzen werden als optische Schnitte mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (TCS-NT) von Leica, das mit einem 63X/1.30 Neofluar Öl-Immersionsobjektiv ausgestattet ist, aufgenommen. Mit Unterstützung durch die TCS-NT-Software erfolgt die Anregung gleichzeitig bei 488 nm (DTAF) und 568 nm (TRITC/ Texas Red) der roten und grünen Fluoreszenz in einem dualen Wellenlängenkanal. Die Einzelaufnahmen werden mit einem Ölimmersionsobjektiv (X63, NA = 1.4) aufgenommen (4-fach akkumuliert, 4-6-fach gezoomt). Anschließend werden die Einzelbilder mit Adobe Photoshop bearbeitet.

3.2.4.3 Immunzytologische Methoden

Hoechst 33258 (5mg/ml Stammlösung (1:500-1:1000 in PBS für Immunfluoreszenz))

3.2.4.3.1 Beschichten von Deckgläschen mit Poly-L-Lysin

Deckgläschen werden in einer feuchten Kammer ausgebreitet und mit 200µl 0.1% Poly-L-Lysin 6000HBr (in aqua bidest) bedeckt. Nach drei Minuten in der geschlossenen Kammer werden die Deckgläschen vorsichtig mit einer Pinzette entnommen und unter einem dünnen Wasserstrahl gespült und staubfrei getrocknet. Nicht adhärente Zellen wie Pachytänspermatozyten werden nach der Fixierung mit 1% PFA mittels Cytospin (1 Minute, 800xg) auf die Deckgläschen aufgebracht und mit Triton X-100 extrahiert (s. auch 3.2.3.2).

3.2.1.2 Kurzzeitkultur von Pachytänspermatozyten mit Okadasäure nach Wiltshire et al. (1995)

Da bekannt ist, daß Hyperphosphorylierungen an der Auflösung der Kernlamina beteiligt sind (z. B. Gerace und Blobel, 1980), wurde von Wiltshire et al. 1995 ein Modell entwickelt, das die Prophase I und den Übergang zur Metaphase I der 1. Meiotischen Teilung simuliert.

Weil es sich bei den phosphorylierten Aminosäuren hauptsächlich um Serine, selten um Threonine handelt, wurde mit Okadasäure ein Phosphatasehemmer ausgewählt, der die Phosphatasen 1 und 2a inhibiert, die zu den Serin-/Threoninkinasen gehören.

Die verwendete Okadasäure ist eine Polyetherkomponente einer C₃₈-Fettsäure und wird aus dem Schwamm *Halichondria okadai* gewonnen (Suganuma et al., 1988; Haystead et al., 1989). Sie ist wasserunlöslich und muß zuerst in reinem Ethanol gelöst werden. Nach Zugabe des gleichen Volumens an Medium, läßt man den Ethanol verdampfen. Damit wird die toxische Wirkung von Ethanol aufgehoben. Parallel wird als Negativkontrolle der gleiche Ansatz ohne Okadasäure vorbereitet.

Kulturmedium für die Kurzzeitkultur von Pachytänspermatozyten nach Wiltshire et al. 1995:

MEM α -Modifikation (25 mM HEPES gepuffert)
25 mM Natriumhydrogencarbonat
10 mM Na-Lactat
sterilfiltrieren

	5% FCS
	1% Pen./Strep.
	pH7.0
Okadasäure (10 mM)	100 µg Okadasäure werden in 500 µl Ethanol gelöst und mit 500 µl Medium aufgefüllt
Kontrollansatz:	500 µl Ethanol werden mit 500µl Medium gemischt

Beide Ansätze werden über Nacht unter der Sterilbank offen stehen lassen, bis ca. die Hälfte verdampft ist. Nach zwölf Stunden ist die verbleibende Ethanolmenge zu gering, um cytotoxisch zu sein.

Die isolierten Pachytänspermatozyten werden in einer Dichte von 2.5×10^6 Zellen/ml über Nacht bei 37°C und 5% Kohlendioxid kultiviert.

3.2.5 Biochemische Methoden:

3.2.5.1 Fraktionierung und Proteinausfällung von kultivierten Pachytänspermatozyten

Um die löslichen und unlöslichen Proteine von einander zu trennen, werden die Zellmembranen der unter 3.2.12 kultivierten Zellen in einem hypotonischen Puffer zerstört.

Dazu werden in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß 1×10^6 Zellen in 300 µl 10 mM kaltem Tris-Puffer (pH 7.4) aufgenommen und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Mehrmals wird die Zellsuspension kräftig resuspendiert. Die Proteine werden durch Pelletierung der unlöslichen Bestandteile in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit (ca. 13000 Upm) und 10 Minuten von den löslichen getrennt. Das Pellet wird in 25 µl Probenpuffer (1x) aufgenommen und eingefroren. Je 100µl Überstand werden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl reinen Methanol, 100 µl Chloroform sowie 300µl aqua bidest gründlich vermischt. Die ausgefällten Proteine werden fünf Minuten in der Zentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen, ohne die Interphase zu beschädigen. Zu der unteren und Interphase werden 300 µl reinen Methanol gegeben und durch vorsichtiges Invertieren vermischt. Die ausgefällten

Proteine werden 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes läßt man den Methanolrest bei Raumtemperatur verdampfen und nimmt das Pellet anschließend in 25 µl 1x Probenpuffer auf. Durch Aufkochen und sorgfältiges Vortexen werden die enthaltenen Proteine denaturiert.

3.2.5.2. SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichtes nach Thomas und Kornberg 1974

Die Auftrennung der Proteine erfolgt über ein Sammel- und ein Trenngel, die sich in pH-wert und unterschiedlicher Acrylamidkonzentration unterscheiden. Die Proteine werden durch den verwendeten Probenpuffer denaturiert. Einige Antikörper erkennen dieses Protein im Western Blot erst wieder, wenn es renaturiert wurde.

Ein 12% Polyacrylamidgel ermöglicht eine gute Auftrennung von Proteinbanden bis zu 30 kDa.

SDS-PAGE:	<u>Trenngel</u>	
	Acrylamidlösung:	30% (w/v) Acrylamid 0.15% (w/v) Bisacrylamid
	<u>Sammelgel</u>	
	Acrylamidlösung	30% (w/v) Acrylamid 0.8% (w/v) Bisacrylamid
	Trenngelpuffer (pH 8.8)	3 M Tris/HCl 0.4% SDS
	Sammelgelpuffer (pH 6.8)	0.75 M Tris/HCl 0.4% SDS
	10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)	
	TEMED	
	Elektrodenpuffer (pH 8.8):	50 mM Tris/HCl 380 mM Glycin 0.1% SDS

Färbelösung:	0.22% Serva Blue R250 40% Methanol 8% Essigsäure	
Entfärbelösung:	30% Methanol 10% Essigsäure	
1x Probenpuffer (6.8)	0.06 M Tris/HCl 5% SDS 10% Glycerin 10% β -Mercaptoethanol	
Pipettierschema: Sammelgel (3.9%)	12.3 ml H ₂ O 5.0 ml SG-Puffer 2.6 ml Acrylamidlösung 0.6 ml 10% APS 20 μ l TEMED	
Pipettierschema: Trenngel (12%)	10.3 ml H ₂ O 7.5 ml TG-Puffer 12.0 ml Acrylamidlösung 0.6 ml APS 20 μ l TEMED	
<u>Proteinmarkerbanden:</u>		
	High Range (MG)	Low Range (MG)
Myosin	200.000	
β -Galactosidase	116.000	
BSA	97 000	
Phosphorylase B	66.000	66.000
Ovalbumin	43.000	43.000
	Karbonat Anhydrase	31.000

Trypsin-Inhibitor	21.000
Lysozym	14.000

Die sauberen und fettfreien Glasplatten werden so aufeinandergelegt, daß die längere Platte nur an einer Seite übersteht. Zwischen die drei deckungsgleichen Seiten werden Abstandshalter („Spacer“) geschoben und durch Klammern fixiert. Zum Abdichten dieser drei Seiten wird aufgekochte 0.5%ige Agarose in die verbleibenden Lücken pipettiert. Nach dem Aushärten der Agarose werden die fixierten Platten aufrecht gestellt und das Trenngel wird vorsichtig zwischen die Platten gegossen. Das Gel wird vorsichtig mit Wasser überschichtet, um ein Austrocknen während des Polymerisierungsprozesses zu verhindern und eine gerade Grenzschicht zu erzeugen. Vorsichtig wird das Wasser mit Whatmanpapier vom erstarrten Trenngel abgesaugt und der gesamte Raum zwischen den Glasplatten mit Sammelgel aufgefüllt. Sofort wird ein Gelkamm in das noch flüssige Sammelgel geschoben. Ist auch dieses Gel auspolymerisiert, können die Klammern und der untere Spacer vorsichtig entfernt werden. Die Glasplatten werden in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und die obere Puffer-Kammer wird mit Elektrodenpuffer gefüllt. Der Gelkamm kann vorsichtig aus dem Gel gezogen werden, während der Puffer die Geldaschen füllt. Mit einer Spritze und einer Kanüle werden die Taschen gerichtet und durchgespült. Die untere Kammer wird ebenfalls mit Elektrodenpuffer aufgefüllt.

Die Proben werden in maximal 20 µl 1x Probenpuffer fünf Minuten bei 95°C aufgekocht. Die denaturierten Proben werden bis zum Auftrag auf das Gel auf Eis gehalten. Ebenfalls denaturierte Proteinmarker werden als Kontrolle mitaufgetragen. Die obere Kammer wird an die Kathode und die untere an die Anode eines stabilisierten Spannungsgerätes angeschlossen.

Die Elektrophorese erfolgt bei 20 mA bis die Bromphenolblaubande ca. 1 cm über dem Gelende läuft. Nach dem Abstoppen der Elektrophorese werden die Glasplatten aus der Apparatur genommen und vorsichtig getrennt. Das Sammelgel wird vorsichtig abgetrennt und verworfen. Die Orientierung des Trenngel wird markiert und es wird für einen Western Blot eingesetzt.

3.2.5.3 Renaturierung der Proteine innerhalb des SDS-Page

Renaturierungspuffer:	4 M Harnstoff
	10 mM Tris
	2 mM EDTA
	50 mM NaCl
	16 mg DTT (frisch zugeben)
	ad 1l H ₂ O, pH7.5

Das Gel kurz erst in Wasser und dann mit Renaturierungspuffer gespült. Nach einer zweistündigen Inkubation in frischem Renaturierungspuffer wird das Gel kurz in Blotpuffer 3 (s. 3.2.2.4) geschwenkt. Nach weiteren 30 Minuten in frischem Blotpuffer 3 wird das Gel beblottet.

3.2.5.4 Western Blot mit Tris-Norleucin-Puffer

Lösung 1:	25 mM Tris/HCl, pH 10.4, 20% Methanol
Lösung 2:	300 mM Tris/HCl, pH 10.4, 20% Methanol
Lösung 3:	25 mM Tris/HCl,
	40 mM Norleucin, pH 9.0-9.4, 20% Methanol

Aufbau des Blots: von unten nach oben in einer Blotkammer:

je 3 Blatt dickes Whatmanpapier mit	Puffer 2
	Puffer 2
	Puffer1
	Nitrocellulose in Puffer1
	Gel in Puffer 3
	3x Puffer 3

Das Blotten erfolgt 2 Stunden bei 0.8-1mA pro cm².

3.2.5.5 Detektion der Proteinbanden auf der Nitrocellulosemembran

Die beblottete Membran wird mit Ponceau S mehrere Minuten angefärbt und anschließend mit aqua bidest gespült bis die Proteinbanden sichtbar werden. Die Markerspur wird abgetrennt und die übrigen Spuren werden mit einem Bleistift markiert.

3.2.2.9 Recycling der verwendeten Membran für einen zweiten Antikörper

Abstripplösung (für Kornberg-Gele, NC-Membranen):

200ml:	0.2M Glycin	3.0g
	0.2M NaCl	2,34g
	pH 2.5 mit konz. HCl	

Die gebrauchte, noch feuchte Membran wird dreimal 20 Minuten in der Abstripplösung geschwenkt. Nach gründlichem Spülen mit TBST-Puffer kann die Membran für eine weitere Detektion mit einem neuen Primärantikörper eingesetzt werden.

3.2.6 Molekularbiologische Methoden

3.2.6.1 Medien für Bakterienkultur:

LB-Medium (für 1 l)	10 g NaCl 10 g Bactopepton 5 g Yeast extract 10 mM MgSO ₄ pH7.4, autoklavieren
LB-Agar	LB-Medium mit 1.5% Agar autoklavieren

3.2.6.2 Einfriermedium für Bakterien

Bakterien werden in Kulturmedium mit 10% autoklaviertem Glycerin bei -70°C eingefroren.

3.2.6.3 Agarosegel-Elektrophorese

Lösungen:

10x TBE	890 mM Tris/HCl 890 mM Borsäure 20 mM EDTA
---------	--

10x DNA-Laufpuffer

50% Glycerin

0.4% Bromphenolblau

0.4% Xylencyanol

in 10x TBE

Ethidiumbromid (10 mg/ml)

Die Agarose wird in 1xTBE gelöst und aufgeköcht. In noch warmen Zustand wird Ethidiumbromid zugegeben und das Gel in die Gelform gegossen und der Gelkamm eingesetzt. Nach der Polymerisation werden mit Laufpuffer versetzte Proben und Marker in die Taschen pipettiert und in der Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die DNA-Banden werden im UV-Licht sichtbar.

3.2.3.4 Ligationen

Ligationsansatz:

50 ng linealisierter Vektor

150 ng linealisierte DNA

4 µl 5x Ligasepuffer

1 µl T4-DNA-Ligase (4U/µl)

mit H₂O ad 20 µl

Der Ansatz wird über Nacht bei 16°C inkubiert. 10µl werden für eine Transformation eingesetzt.

3.2.6.5 Herstellung kompetenter Bakterien nach Chung et al. (1989)

200 ml E. coli werden bei 37°C im Schüttler einige Stunden kultiviert bis sie sich in der frühen exponentiellen Phase befinden. Die OD₆₀₀ liegt dabei zwischen 0.35 bis 0.55. Die Bakterien werden bei 4°C 1000x g zehn Minuten zentrifugiert.

Die Bakterien werden in 5 ml (entspricht 1/40 des Ausgangsvolumens) eiskaltem TSS (LB-Broth mit 10% PEG (Mr 3350 oder 8000), 5% DMSO und 20-50 mM MgCl₂, pH 6.5) sorgfältig resuspendiert. Aufgeteilt in 100 µl Portionen werden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

3.2.6.6 Transformation kompetenter Bakterien

Die gefrorenen Zellen werden langsam auf Eis aufgetaut und anschließend sofort mit 100 pg Plasmid-DNA oder einem halben Ligationsansatz gut vermischt. Der Transformationsansatz wird 40 Minuten auf Eis gehalten. Der Transformationsansatz wird für 30-60 Sekunden auf 42°C im Heizblock erwärmt. Die Bakterien werden in 400 µl LB-Medium aufgenommen und 45-60 Minuten bei 37°C unter Schütteln kultiviert.

Auf einer 6 cm LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum wird ein Zehntel des Ansatzes ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

3.2.6.7 Übernachtkultur einzelner Klone

Mittels einer sterilen Impföse werden einzeln Klone von den ausplattierten transformierten Bakterien in 5 ml Kulturmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum übertragen und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

3.2.3.8 Plasmid-DNA-Isolierung (Minipreps: Li et al., 1997)

GTE-Puffer:	50 mM Glucose 10 mM EDTA, pH 8.0 25 mM Tris-HCl, pH 8.0
Lösung 2:	0.2 N Natronlauge 1% SDS
Lösung 3:	60 ml 5 M Kaliumacetat 11.5 ml Eisessig 28.5 ml aqua bidest

Es werden 2 ml einer Übernacht-Kultur in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und in einer Tischzentrifuge 30 Sekunden bei 10.000x g abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Bakterien werden in 50 µl GTE-Puffer durch Vortexen gründlich resuspendiert. Nach dem Aufbrechen der Zellen mit 100µl Lösung 2 wird das Reaktionsgefäß mehrfach vorsichtig invertiert, um die chromosomale DNA nicht

durch Scherkräfte zu zerstören und so die Plasmid-DNA zu verunreinigen. Um diese nun von einander zu trennen, werden die chromosomale DNA und die Proteine durch 75 µl Lösung 3 ausgefällt. Der weißliche Niederschlag wird bei 10.000x g 30 Sekunden abzentrifugiert. Der Plasmid-DNA-haltige Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen eiskaltem 100%igen Ethanol versetzt und sofort fünf Minuten bei 10.000x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Plasmid-DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Es kann sofort in Millipore-Wasser aufgenommen und für einen Verdau eingesetzt werden.

3.2.6.9 Kontrollverdau der Plasmid-DNA einzelner Klone

Um die Qualität einzelner Klone zu prüfen, werden nach folgendem Standard Probeverdaue angesetzt.

Standardverdau von Plasmid-DNA:	1 µg DNA
	1 U Restriktionsenzym
	2 µl 10x Restriktionspuffer
	ad 20µl H ₂ O

Der Ansatz wird zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

3.2.3.10 Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration im UV-Spektrometer

Die Konzentration der gelösten DNA wird photometrisch bestimmt. Gemessen wird die Absorption bei 260 und 280 nm. Für eine exakte Konzentrationsbestimmung sollte der Meßwert E (= Extinktion) zwischen 0.1 und 1 liegen. Ein Wert von 1 bei OD₂₆₀ entspricht 40 µg/ml Plasmid-DNA. Liegt der Quotient von OD₂₆₀/OD₂₈₀ nicht zwischen 1.8 und 2, deutet dieses auf eine Proteinkontamination hin.

DNA-Konz. (µg/ml) = E x 40µg7ml x Verdünnung

Ausfällen der DNA: Die DNA-Lösung wird mit 1/10 Vol. 3M Natriumacetat und 3 Volumina 100% reinem Ethanol gemischt und bei 13000 Upm 30 Minuten in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 70% Ethanol läßt man den Restethanol verdampfen. Die DNA wird in der benötigten Konzentration in Wasser aufgenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Lamin C2 in den Pachytänspermatozyten

Da die mechanische Stabilität der Pachytänspermatozyten gegenüber der somatischer Zellen stark herabgesetzt ist, liegt es nahe, daß die Kernlamina, deren netzartiger Struktur eine stabilisierende Wirkung zugeschrieben wird, hierfür verantwortlich ist. Hauptbestandteile dieser Lamina sind die sogenannten Lamine, Proteine, die zur Familie der Intermediärfilamente gehören und in somatischen Zellen kontinuierlich innerhalb der Kernhülle verteilt sind. Die Kernlamina der Pachytänspermatozyten weicht in ihrer Zusammensetzung von der somatischer Zellen ab.

Bisher wurden zwei meiosespezifische Splicingvarianten eines A-Typ und eines B-Typ Lamins, Lamin C2 bzw. Lamin B3 (Furukawa und Hotta, 1993), nachgewiesen, denen das Fehlen des funktionell wichtigen Aminoterminus gemeinsam ist. Lamin A, C und B2 sind nicht nachweisbar. Daraus ergibt sich die Frage nach der besonderen Struktur und Funktion der Kernlamina während der Meiose. Im Verlauf der Prophase I scheint Lamin C2 zeitgleich mit der Reorganisation des Chromatins aufzutreten, so daß sich die Frage nach möglichen funktionellen Zusammenhängen stellt, denn die Regulation der Kondensation, Paarung und Bewegung der homologen Chromosomen ist bisher ungeklärt.

4.1.1 Lokalisation von Lamin C2 im Hoden der Ratte mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Darstellung des Lamin C2 wurde der mAK R27 eingesetzt. Die folgende Immunfluoreszenzmikroskopie, die auf schockgefrorenem Hodengewebe durchgeführt wurde, zeigt, wie groß die Diskrepanz zwischen der Signalstärke von A-Typ Laminen in somatischen Zellen und des meiosespezifischen Lamin C2 in

Pachytänspermatozyten ist (Abb.4.1). Mit Hilfe eines Texas-Red-gekoppelten sekundären Antikörpers gegen IgM aus Maus wird R27 lokalisiert. Als stadienspezifischer Marker für die meiotische Prophase I wird das polyklonale Serum aus Meerschweinchen gegen SCP3 (α -SCP3, Alsheimer und Benavente, 1996) eingesetzt. Es erkennt ein Protein der Lateralelemente (LE) des Synaptonemalkomplexes (SC) vor, während und nach der Synapse. Ein DTAF-gekoppelter sekundärer Antikörper bindet an α -SCP3. Die DNA wird mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 angefärbt und gibt Auskunft über die Verteilung des Chromatins in den Zellkernen.

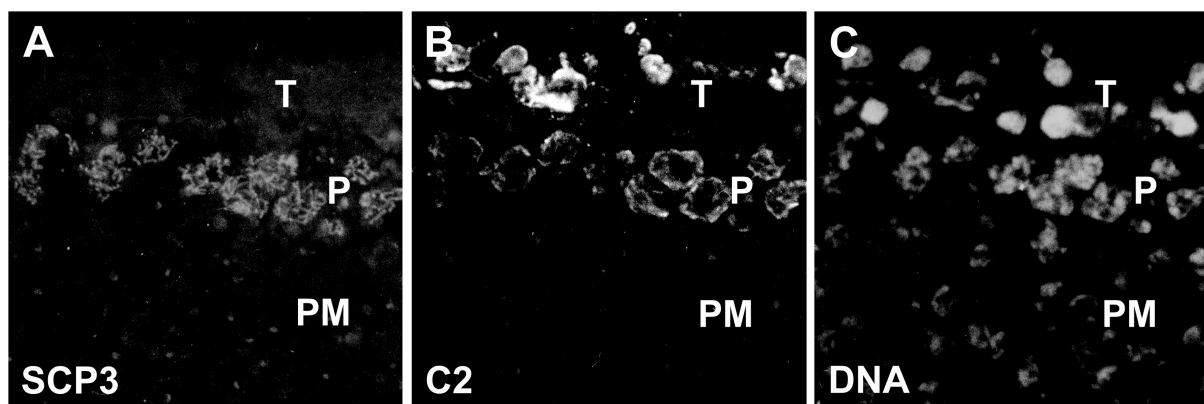


Abb.4.1: Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie auf einem 6 μ m dünnen Gefrierschnitt von Rattenhoden. Gezeigt wird der Ausschnitt eines quer angeschnittenen Tubulus. Bild A zeigt die mit α -SCP3 markierten SCs der Pachytänspermatozyten. Bild B zeigt die von R27 erkannten A-Typ Lamine in somatischen und meiotischen Zellen. In Bild C ist die DNA mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 angefärbt. T: somatische Zellen zwischen den Tubuli; P: Pachytänspermatozyten, PM: postmeiotische Stadien.

In den Tubuli der Hoden zeigen nur die von SCP3 (Abb.4.1.A) markierten Zellen ein schwaches Immunfluoreszenzsignal von R27 (Abb.4.1.B). Dieses befindet sich ausschließlich im Bereich der Kernhülle. Die somatischen Zellen außerhalb der Tubuli zeigen in der Kernperipherie eine deutlich stärkere Fluoreszenz. Die markierte DNA in Abb.C zeigt die Lokalisation und den Kondensationsgrad der DNA. R27 erkennt in den Pachytänspermatozyten ein Protein in der Kernhülle, daß ein deutlich schwächeres Signal als in somatischen Zellen (T) erzeugt. Weder in sich mitotisch teilenden Spermatogonien noch in postmeiotischen Zellen (PM) ist eine Markierung in der Kernperipherie zu sehen. Daß es sich in den Pachytänspermatozyten um das

schon beschriebene Lamin C2 handelt, wird im folgenden Western Blot mit mAK R27 bestätigt.

4.1.2 Nachweis der 52 kDa-Bande von Lamin C2 in einem denaturierenden SDS-Page nach Kornberg und Thomas (1974) durch den mAk R27 und seine Nachweisgrenze.

Im Western Blot eines 10%igen SDS-Page (Thomas und Kornberg, 1974) von Pachytänspermatozyten erkennt R27 ausschließlich eine Proteinbande, das Lamin C2 (52kb) (Smith und Benavente, 1992). Die aus somatischen Zellen bekannten Lamine A (70 kDa) und Lamin C (60 kDa) fehlen.

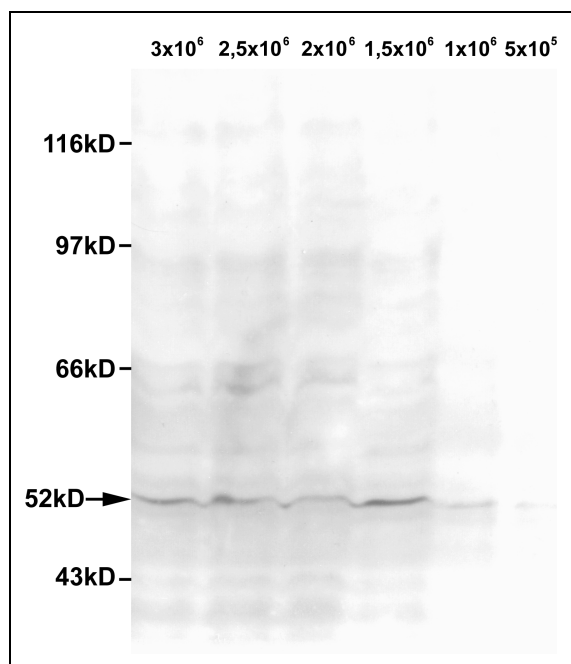


Abb.4.2: Western Blot: R27 markiert das einzige in Pachytänspermatozyten nachweisbare A-Typ Lamin: Lamin C2 (52 kDa).

Das stärkste Signal von R27 erhält man bei 1.5×10^6 Zellen pro Spur. Bei größeren Mengen nimmt die absolute Signalstärke wieder ab. Darum werden in den folgenden Versuchen 1.5×10^6 Zellen pro Spur eingesetzt.

4.2 Immunlokalisation von Lamin C2, Lamin B1, LAPs2 und p62 in der Kernhülle von Pachytänspermatozyten

4.2.1 Immunfluoreszenzmikroskopie zur räumlichen Verteilung von Lamin C2 und anderen Kernhüllenproteinen im Vergleich mit Synaptonemalkomplexprotein 3

Da die Immunfluoreszenzsignale mit mAk R27 auf Gefrierschnitten des Rattenhodens keine hinreichende Aussage über die Verteilung von Lamin C2 innerhalb der Kernperipherie zulässt, war es notwendig, die Verteilung dieses Proteins an intakten Pachytänspermatozyten zu untersuchen. Dafür wurden Pachytänspermatozyten in 1% PFA fixiert. Die Zugänglichkeit der Kernhülle für die verwendeten Antikörper wurde mit einer kurzen Extraktion mit Triton X-100 (0.05%) erzielt. Als erstes wurde die Verteilung verschiedener Kernhüllenproteine in Pachytänspermatozyten untersucht: Da bekannt ist, daß Kernporenkomplexe während der Prophase nicht zufällig in der Kernhülle verteilt sind (Fawcett und Chemes, 1979), sondern in Gruppen auftreten, gibt ein Antikörper gegen ein Kernporenkomplexprotein einen guten Anhaltspunkt über die Zuverlässigkeit der Präparation.

Verwendet für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden: mAK p62, der das Kernporenkomplexprotein p62 erkennt (Benavente et al., 1989), mAK pKB8, der in Spermatozyten nur Lamin B1, in somatischen Zellen zusätzlich Lamin A und C erkennt (Krohne et al., 1984), mAK 13d4, der die drei Splicingvarianten von LAPs2 erkennt (Alsheimer et al., 1998) und mAK R27, der in Spermatozyten nur Lamin C2, in somatischen Zellen ebenfalls Lamin A und C erkennt (Höger et al., 1991, Smith und Benavente, 1992). Als Sekundärantikörper wurden Texas-Red-gekoppelte Antikörper gegen Maus verwendet

Der Antikörper gegen p62 erzeugt eine diskontinuierliche Markierung innerhalb der Kernhülle (A). Die Antikörper gegen Lamin B1 und LAPs2 markieren dagegen die Kernhülle kontinuierlich (B und C). Die Signale von Lamin C2 verteilen sich diskontinuierlich innerhalb der Kernperipherie (D).

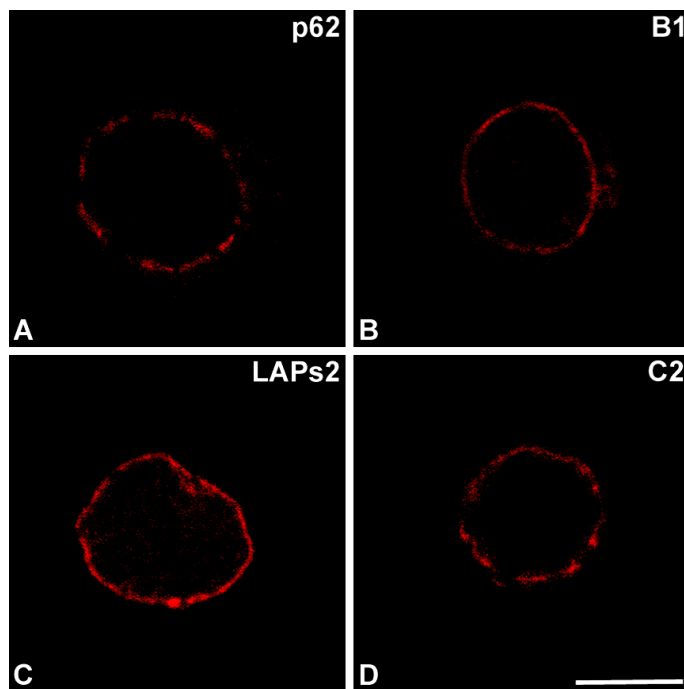


Abb.4.3: Immunlokalisation des Kernporenkomplexprotein p62 (A), Lamin B1 (B), LAPs2 (C) und Lamin C2 (D) in den Pachytänspermatozyten der Ratte. (aufgenommen mit konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop). Eichstrich:10µm

Die Fluoreszenzsignale von p62 in Pachytänspermatozyten bestätigen die schon beschriebene Verteilung der Kernporenkomplexe in Gruppen. Die Antikörper gegen LAPs2 und Lamin B1 erzeugen eine kontinuierliche Markierung der Kernhülle wie in somatischen Zellen. Gleichzeitig bestätigen sie damit die Integrität der Kernperipherie. Eine Überraschung stellt jedoch die diskontinuierliche Lokalisation von Lamin C2 dar, denn die übrigen A-Typ Lamine A und C in somatischen Zellen verteilen sich kontinuierlich innerhalb der Kernhülle. Daraus ergibt sich die Frage, ob eine spezielle Funktion damit in Zusammenhang steht. In einer Doppellokalisierung mit SCP3 soll eine mögliche Beziehung zu den verschiedenen Proteinen der Kernhülle untersucht werden.

4.2.2 Räumliche Darstellung der Anheftungsstellen der Synaptonemalkomplexe (SCs) an der Kernperipherie von Pachytänspermatozyten.

Um zu klären, ob möglicherweise ein räumlicher Zusammenhang zwischen der Lokalisation von Lamin C2 während der Prophase I und den Anheftungsstellen des SC besteht, wurde eine Doppellokalisierung mit R27 und α -SCP3 auf PFA/Triton-fixierten Pachytänspermatozyten durchgeführt. Als Sekundärantikörper für R27 dient ein Texas-Red-gekoppelter Antikörper gegen IgM aus Maus. α -SCP wird von einem DTAF-gekoppeltem Sekundärantikörper gegen IgG aus Meerschweinchen erkannt.

Mit einem konfokalen Mikroskop werden drei aufeinander folgende optische Schnitte durch eine Pachytänspermatozyte gelegt. Die beiden Fluoreszenzsignale einer Schnittebene werden per Computer übereinandergelegt (overlay). In den Bereichen, in denen die Signale von DTAF und Texas-Red überlagern, erscheint ein gelbes Signal.

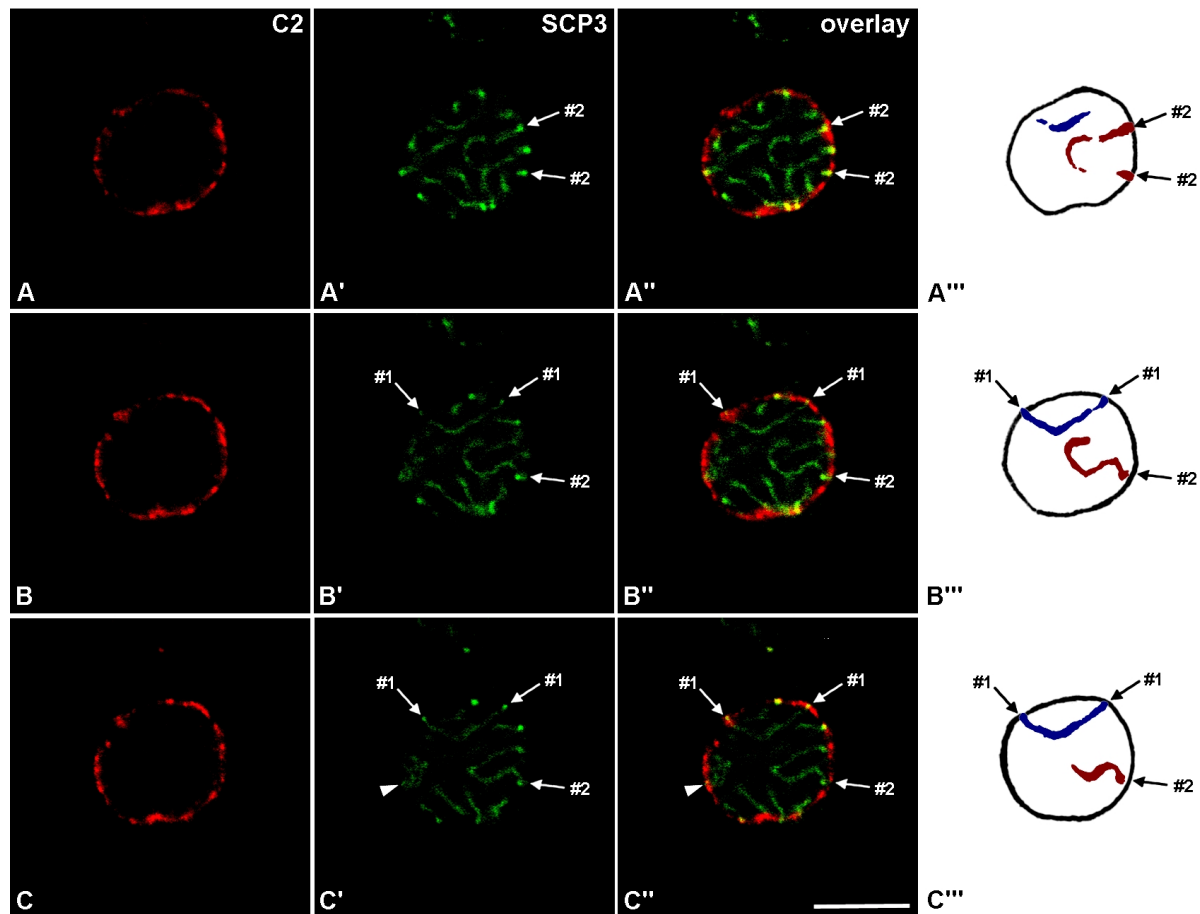


Abb.4.4: Doppelimmunlokalisation von Lamin C2 und SCP3 in drei aufeinander folgenden optischen Schnitten durch eine Pachytänspermatozyte der Ratte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (Lamin C2 (Texas Red): A-C; SCP3 (DTAF): A'-C'; Overlay (rotes, grünes und gelbes Signal): A''-C''). Die Skizzen A'''-C''' dienen der räumlichen Orientierung. Die Pfeile verweisen auf die oft verdickten SC-Enden. Die Pfeilspitzen markieren einen XY-Body. Der Abstand der einzelnen Ebenen liegt bei ungefähr 0.26µm. Eichstrich:10µm

Die Immunfluoreszenzsignale (Abb.4.4, A-C) bestätigen die diskontinuierliche Verteilung von Lamin C2, wie schon in Abb.4.3 gezeigt werden konnte. Die verschiedenen optischen Ebenen zeigen die sich verändernden Lamin C2-reichen Regionen. Das Signal des Synaptonemalkomplexprotein SCP3 ist in den oft

verdickten Enden besonders stark (A'-C'). Als Hilfe für die Orientierung der SCs innerhalb des Zellkerns sind zwei besonders gut erkennbare SCs nummeriert. In den Overlays (A''-C'') der drei Schnittebenen ergibt sich folgendes Bild: Jedes genau angeschnittene SC-Ende ist im Bereich der Kernperipherie gelb markiert.

Die gelben Markierungen belegen, daß die SC-Enden tatsächlich in Lamin C2-reichen Abschnitten der Kernperipherie inserieren. Diese Koloalissation betrifft nicht nur die SC-Enden der Autosomen (s. Pfeile), sondern auch den stark kondensierten XY-Body (s. Pfeilspitze), der ebenfalls innerhalb eines Lamin C2-reichen Abschnitts an die Kernhülle geheftet ist.

4.2.3 Immunfluoreszenzmikroskopie zur räumlichen Verteilung von Lamin C2 und anderen Kernhüllenproteinen im Vergleich zu Synaptonemalkomplexprotein 3

Im Vergleich der Lokalisation der Kernhüllenproteine p62 (entspricht der Lokalisation des Kernporenkomplexes), Lamin B1, LAPs2 und Lamin C2 mit den SC-Enden soll ein Modell für die Kernhülle meiotischer Zellen entworfen werden. Als Sekundärantikörper gegen p62, Lamin B1, LAPs2 und Lamin C2 wird ein Texas-Red-gekoppelter Antikörper gegen Maus IgG/IgM eingesetzt. α -SCP3 wird mit einem DTAF-gekoppeltem Sekundärantikörper gegen Meerschweinchen IgG markiert. Eine Doppellokalisierung von R27 gegen Lamin C2 mit dem Humanserum MAN gegen LAPs2 (Paulin-Levasseur et al., 1996) soll die unterschiedliche Verteilung der beiden Proteine innerhalb einer intakten Kernhülle unterstreichen. Als sekundärer Antikörper wird ein DTAF-gekoppelter Antikörper gegen IgG aus Mensch eingesetzt.

In Abb.4.5 zeigt die Doppellokalisierung des Kernporenkomplexes p62 und den SC-Enden (A-A''), daß beide Proteine nicht koloalisieren, denn es zeigen sich bei der Überlagerung beider Fluoreszenzen keine gelben Signale (A''). Die in meiotischen Zellen ungleichmäßig innerhalb der Kernhülle verteilten Kernporenkomplexe (A) liegen ausschließlich außerhalb der Bereiche der Kernhülle, an denen die SC-Enden (A') angeheftet sind.

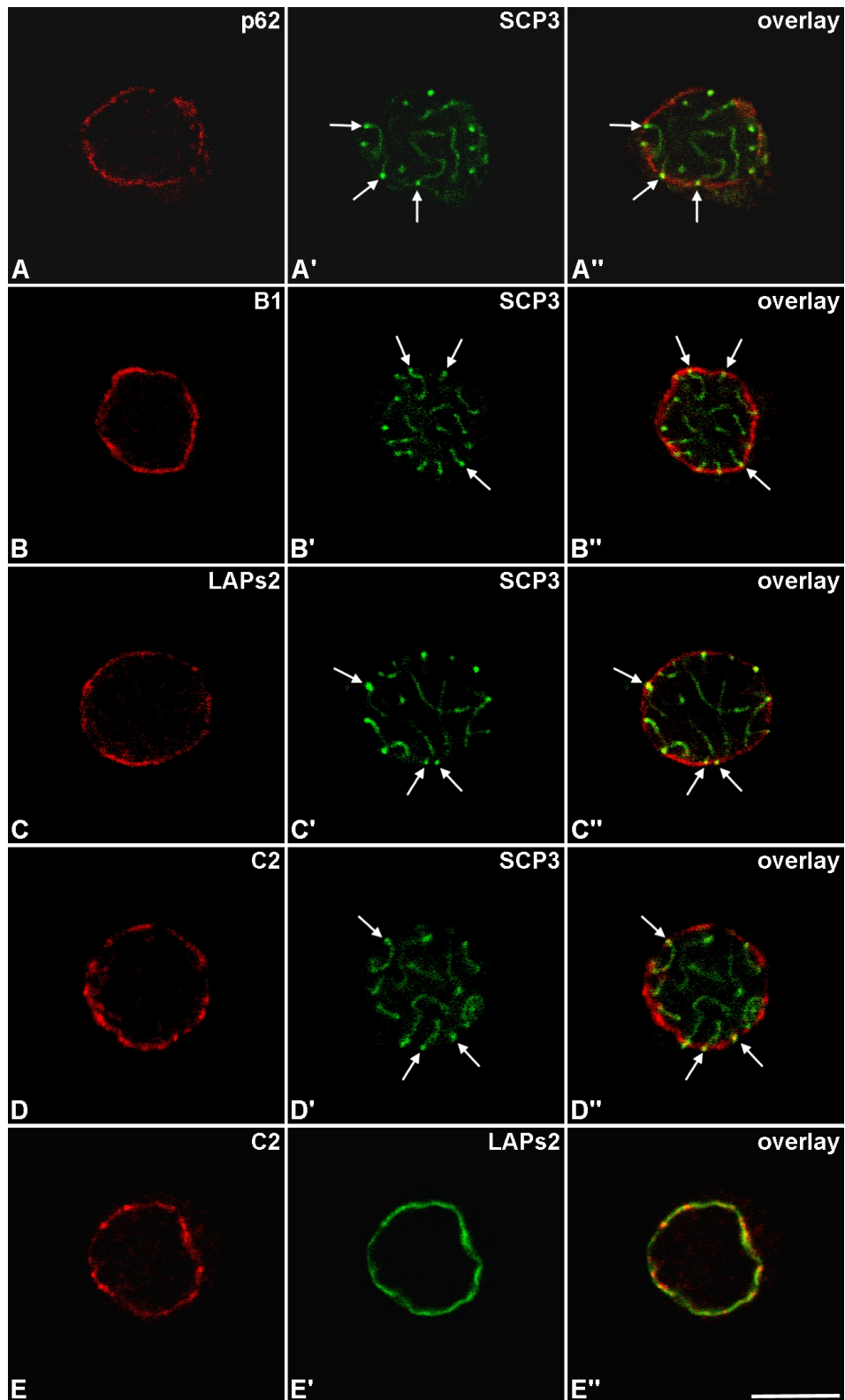


Abb. 4.5: Doppellokalisierung von Proteinen der Kernhülle mit SCP3: Antikörper gegen Kernporenkomplexprotein p62 (A-A''), Lamin B1 (B-B''), LAPs2 (C-C'') und Lamin C2 (D-D''). Als Integritätskontrolle der Kernhülle wurde eine Doppellokalisierung von Lamin C2 mit LAPs2 (E-E'') durchgeführt. Pfeile verweisen auf die SC-Enden. Eichstrich: 10µm

Durch die kontinuierliche Verteilung von Lamin B1 (B) kommt es zwangsläufig an den SC-Anheftungsstellen (B') an der Kernhülle zu Koloalisationen in diesen Bereichen. Es gibt keine sichtbaren Aussparungen des Lamin B1 an den SC-Anheftungsstellen (B'').

LAPs2 (C) zeigt eine kontinuierliche Verteilung innerhalb der Kernhülle und zeigt an den Anheftungsstellen der SC-Enden ein gelbes Signal. LAPs2 koloalisiert mit SCP3 (C', C'') innerhalb der Kernhülle. Diese Zelle zeigt, wie beide SC-Enden an der Kernhülle angeheftet sind, während der mittlere Teil in das Kerninnere ragt.

Lamin C2 (D) ist diskontinuierlich innerhalb der Kernhülle verteilt, wobei die SC-Enden (D') stets innerhalb einer Lamin C2-Anreicherung an der Kernhülle angeheftet sind (D''), wie die gelben Signale innerhalb der Kernhülle belegen.

Als Kontrolle zeigt eine kontinuierliche Markierung der Kernperipherie durch das MAN-Serum (E''), daß LAPs2 erkennt, Lamin C2 (E) im Gegensatz dazu nicht gleichmäßig innerhalb der Kernhülle verteilt ist (E''). Damit ist der Beweis erbracht, daß es sich bei der Verteilung von Lamin C2 keinesfalls um ein Artefakt handelt.

4.2.4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Lokalisation von Lamin B1 und Lamin C2 im Vergleich zu den SC-Anheftungsstellen

In einem weiteren Versuch sollen die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie auf elektronenmikroskopischer Ebene überprüft werden. Diese Zellen werden mit R27 gegen Lamin C2 bzw. pKB8 gegen Lamin B1 inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein Peroxidase-gekoppelter Antikörper gegen IgG/IgM aus Maus eingesetzt. Ein elektronendichter Niederschlag aus Diaminobenzidin markiert die Lokalisation von Lamin C2 bzw. Lamin B1 innerhalb der Kernhülle.

In Abb. 4.6 belegt der kontinuierlich verteilte Niederschlag von Diaminobenzidin (DAB) auf der nukleoplasmatischen Seite die gleichmäßige Verteilung von Lamin B1 innerhalb der Kernhülle (A, B). An den Anheftungsstellen der SCs zeigt sich keine Abweichung gegenüber den SC-freien Bereichen.

Verglichen damit zeigt Lamin C2 im Bereich der SC-Enden eine deutliche Anreicherung innerhalb der Kernhülle (C, D, F), während es gleichzeitig nieder-

schlagsfreie Abschnitte entlang der Kernhülle gibt (E). Sogar im Bereich des XY-Bodys kann der DAB-Niederschlag nachgewiesen werden. Eine Korrelation zwischen Lamin C2 und den Anheftungsstellen der SCs ist damit sicher.

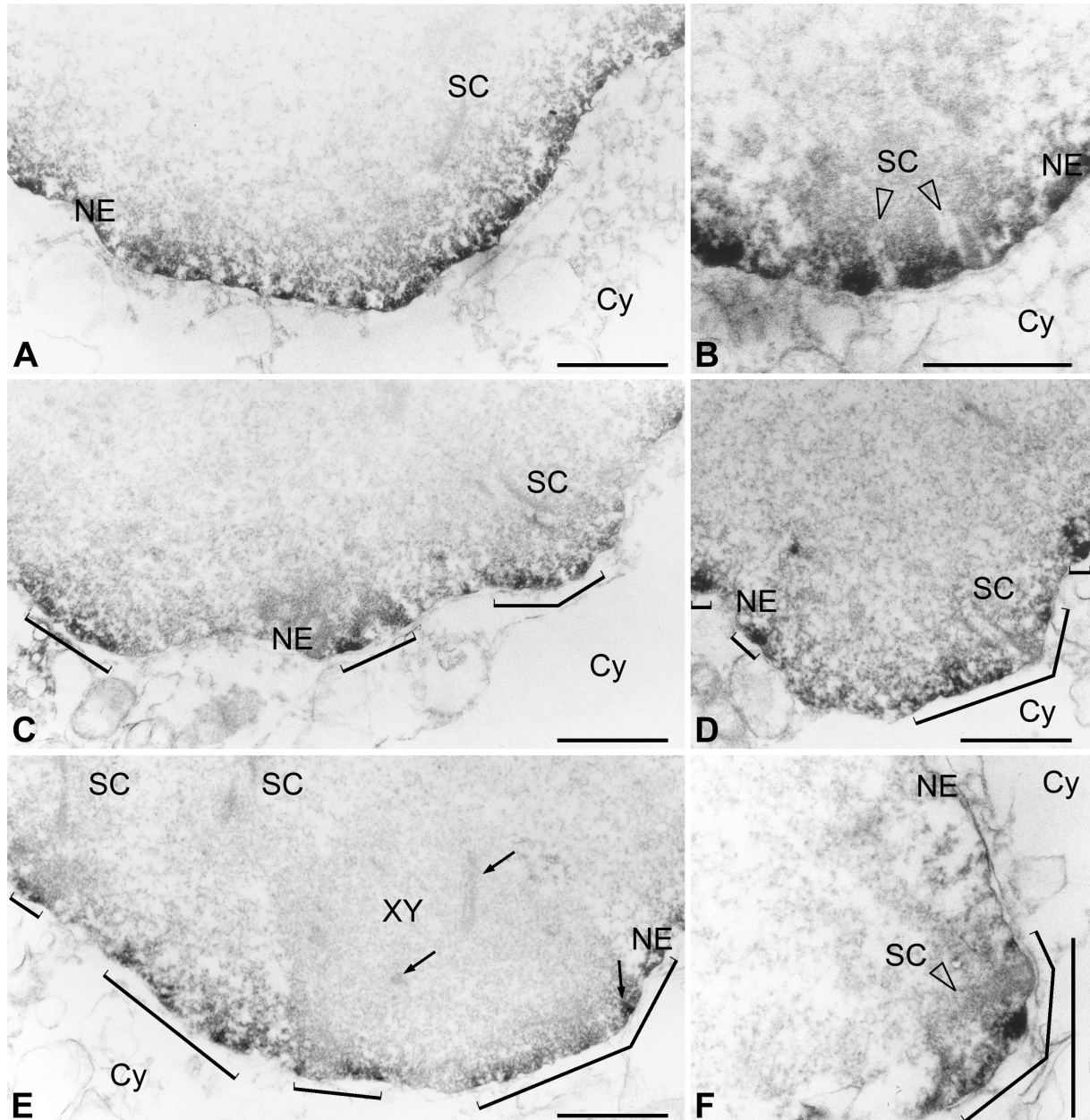


Abb.4.6: A, B zeigen die Lokalisation von Lamin B1 innerhalb der Kernhülle mittels DAB; C-F zeigen die Lokalisation von Lamin C2 innerhalb der Kernhülle mittels DAB.

CY, Zytoplasma; SC, Synaptonemalkomplex; NE, Kernhülle; XY, XY-Body. Die Pfeilspitzen verweisen auf SCs und kleinen schwarzen Pfeile auf die synapsierten Abschnitte des X- und Y-Chromosoms. Eichstrich: 0.1µm

4.3 Pachytänspermatozyten ohne und nach Kultur mit dem Phosphatasehemmer Okadasäure

Neben der Frage wann und zu welchem Zweck Lamin C2 während der Spermatogenese in Erscheinung tritt, ist ebenso der genaue Zeitpunkt und die Art und Weise des Verschwindens ungeklärt. Aufgrund technischer Schwierigkeiten, können die entsprechenden Entwicklungsstadien nicht direkt untersucht werden. Sicher ist nur, daß in postmeiotischen Zellen Lamin C2 nicht mehr nachzuweisen ist (Alsheimer und Benavente, 1996). Ein von Wiltshire et al. 1994 etabliertes Modell für die Kurzzeitkultur von Pachytänspermatozyten ermöglicht, den Übergang Pachytän-Metaphase I unter Kulturbedingungen zu untersuchen. In diesem Modell wird die Prophase I von etwa drei Tagen auf sechs Stunden verkürzt. Die homologen Chromosomen durchlaufen ihre Kondensation und Umorganisation wie es für Pachytänspermatozyten in vivo beschrieben wurde. Nach Durchlaufen eines mit dem Diplotän vergleichbaren Stadiums löst sich die Kernhülle auf und endet in der Metaphase I (Cobb et al., 1999). Die in diesem Modell eingesetzte Okadasäure hemmt die Serin- und Threoninphosphatasen PP1 und PP2a (Suganuma et al., 1988, Haystead et al., 1989; Übersicht in Dawson und Holmes, 1999), die als Kandidaten für die Dephosphorylierung bestimmter Phosphorylierungsstellen innerhalb der Lamine gelten. Punktmutationen dieser Phosphorylierungsstellen (Haas und Jost, 1993; Heald und McKeon, 1990) hemmten in somatischen Zellen den Zerfall der Kernhülle und bestätigten so die Abhängigkeit der Kernhülledynamik während des Zellzyklusses von dem Phosphorylierungsstadium der Lamine (Jost und Haas, 1993).

Daneben wird von Cobb et al. (1999) der mittelbare Einfluß von Okadasäure auf die Aktivierung des Metaphase-Promoting-Faktor (MPF=p34^{cdc2}/Cyclin B1) dargestellt, dessen Aktivität in Pachytänspermatozyten von Ratte und Maus nachgewiesen wurde (Chapman und Wolgemuth, 1994, Wiltshire et al., 1994), der durch die Dephosphorylierung von CDC2 aktiviert wird. Diese Dephosphorylierung erfolgt durch CDC25C, die auch in Pachytänspermatozyten nachgewiesen wurde (Wu und Wolgemuth, 1995). Cobb et al., 1999, Handel et al., 1995 und Wiltshire et al., 1995 haben gezeigt, daß dieses Modell tatsächlich die in vivo beobachteten Phänomene, wie sie während des G2/Metaphase-Übergang auftreten, reproduziert. Dazu gehören die Kondensation der Chromosomen, wie auch die H1-Kinase-Aktivität des MPF, die

Chiasmatabildung am Ende des Pachytäns und die Auflösung der Kernhülle. Daß dieses Modell im Zusammenhang mit der Auflösung der Kernhülle durch Phosphorylierung von Laminen interessant ist, zeigen die Veröffentlichung von Dessev et al., 1991. Diese zeigt, daß ein Komplex aus p34^{cdc2}/Cyclin B in vitro in der Lage ist, Lamine zu phosphorylieren und die Kernhülle von Muschel-Oozyten aufzulösen.

4.3.1 Immunfluoreszenzmikroskopie von Pachytänspermatozyten vor und nach der Kultur mit Okadasäure

Die durch zentrifugale Elutriation bis auf 85% angereicherten Pachytänspermatozyten (Meistrich, 1977) wurden über Nacht in einem Spezialmedium (siehe Material und Methoden) für Pachytänspermatozyten kultiviert. Nach Zugabe von 10µM Okadasäure werden die Zellen weiter bei 32°C und 5% CO₂ inkubiert (siehe 3.2.12, nach Wiltshire et al., 1995). Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden frisch isolierte, über Nacht kultivierte sowie mit Okadasäure behandelte Zellen (nach drei bzw. sechs Stunden) in Methanol/Aceton fixiert. Parallel wurden als Kontrolle unbehandelte Zellen für weitere sechs Stunden mitkultiviert. Die Effekte auf Pachytänspermatozyten der Ratte wurden unter Verwendung des mAk R27 und des α-SCP3-Serums analysiert.

Die Kontrollzellen zeigen nach insgesamt 18h unter Kulturbedingungen(E-E'') keine Veränderungen gegenüber frisch isolierten Zellen (A-A'') bzw. nur über Nacht kultivierten Zellen (B-B''). Der Zustand der Synaptonemalkomplexe - durch α-SCP3 sichtbar gemacht - ist ebenso unverändert wie die Markierung der Kernhülle durch R27. Die Inkubation von bis zu 18 Stunden hat damit keinen signifikanten Einfluß auf das Entwicklungsstadium der Spermatozyten und die Integrität der Kernhülle. Bis auf wenige Ausnahmen befinden sich alle Zellen bis zu diesem Zeitpunkt im mittleren Pachytänstadium.

Im Gegensatz dazu treten nach nur drei Stunden Inkubation mit 10µM Okadasäure deutliche Veränderungen sowohl bei den SCs als auch der Kernhüllenmarkierung durch R27 auf. Die Kernhülle zeigt eine schwächere Markierung und die SCs sind fragmentiert. Entsprechend des Kondensationsgrades zeigt die DNA größere lokale Akkumulationen.

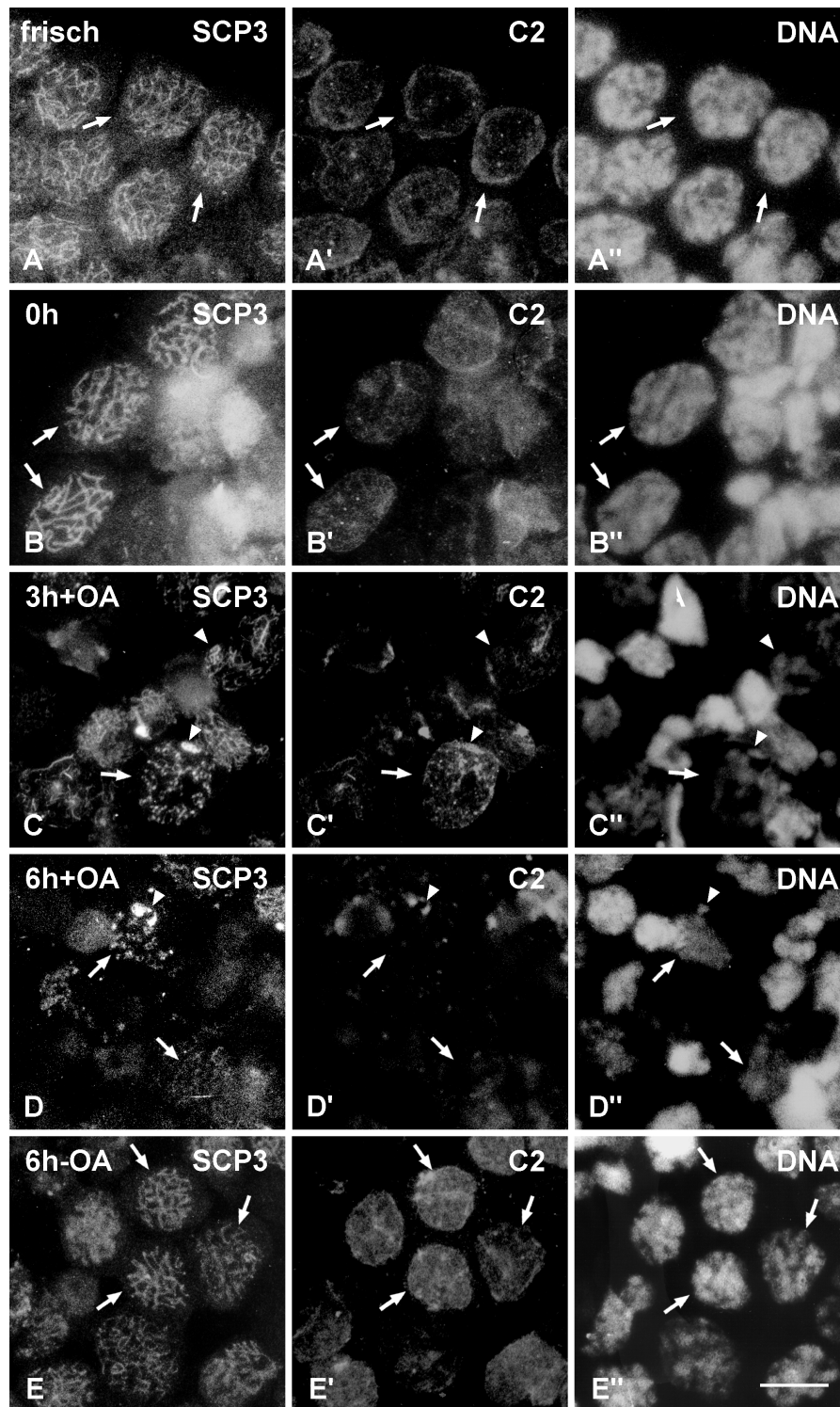


Abb. 4.7: Kurzzeitkultur von Pachytänspermatozyten mit Okadasäure. Frisch: direkt nach der Isolierung fixierte Zellen. 0h: über Nacht in Spezialmedium (Wiltshire et al., 1995) kultivierte Zellen, 3h+OA: drei Stunden in 10 μ M Okadasäure inkubierte Zellen; 6h+OA: sechs Stunden in 10 μ M Okadasäure inkubierte Zellen; 6h-OA: Kontrollzellen: sechs Stunden ohne Okadasäure; A-E: Lokalisation von SCP3 auf Pachytänspermatozyten; A'-E': Lokalisation von Lamin C2 auf Pachytänspermatozyten; A''-E'': DNA-Färbung mit Hoechst 33258. Die Pfeile markieren stadienspezifische Zellen und die Pfeilspitzen XY-Bodies. Balken 10 μ m

Nach sechs Stunden hat die Fragmentierung der SCs weiter zugenommen. Die Signalstärke für SCP3 hat abgenommen und eine schwache Hintergrundfluoreszenz wird sichtbar. In diesen Zellen ist eine Markierung der Kernhülle durch R27 nicht mehr zu erkennen. Die DNA-Färbung zeigt, daß die DNA in diskreten Akkumulationen innerhalb des Zellkerns konzentriert ist.

Um Klarheit über den genauen Zeitpunkt zu bekommen, ab dem Lamin C2 durch R27 nicht mehr nachweisbar ist, wurden Lamin C2 und weitere Proteine der Kernhülle der Pachytänspermatozyten in einem Western Blot analysiert.

4.3.2 Western Blot von Pachytänspermatozyten mit mAk gegen Lamin C2 mit und ohne Behandlung mit Okadasäure

Um zu erfahren, ob und welchen Modifikationen Lamin C2 im Verlauf der Prophase I unterworfen ist, wurden Pachytänspermatozyten, wie beschrieben, kultiviert. Besteht bei Lamin C2 wie bei den somatischen A-Typ Laminen in der Mitose (Ottaviano und Gerace, 1986) ein Zusammenhang zwischen einer Hyperphosphorylierung und der Auflösung der Kernhülle, so könnte dieses möglicherweise durch eine verringerte Laufgeschwindigkeit in einem SDS-Page nachgewiesen werden. Ein Western Blot soll erste Anhaltspunkte darüber liefern.

Verglichen werden soll das zeitliche Auftreten von Lamin C2 in mit Okadasäure behandelten Pachytänspermatozyten mit unbehandelten Kontrollen sowie RV-SMC-Zellen, die als somatische Zellen in der Interphase zwei andere A-Typ Lamine in die Kernlamina integriert haben.

Die 52 kDa Bande von Lamin C2 ist schon nach drei Stunden Inkubation mit 10µM Okadasäure nicht mehr nachweisbar. Nach sechs Stunden fehlt diese Bande ebenfalls. Die Kontrollen ohne Okadasäure dagegen zeigen sowohl nach drei Stunden wie auch sechs Stunden die 52 kDa-Bande.

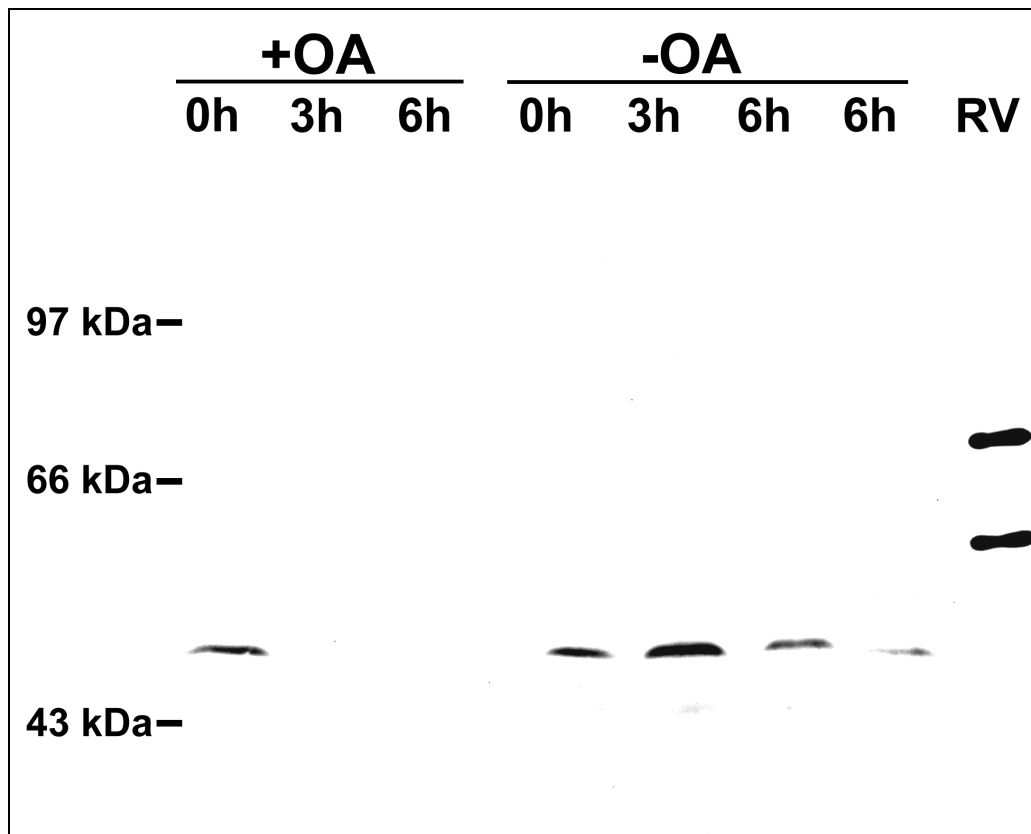


Abb.4.8: Western Blot mit mAk R27 auf Pachytänspermatozyten: Kultur mit Okadasäure (+OA, 10 μ M) und ohne (-OA) (nach Wiltshire et al., 1995). Die Zellen wurden nach null, drei und sechs Stunden geerntet. Auf der zweiten Spur sechs Stunden (-OA) wurden Zellen aufgetragen, die mit Restspuren Ethanol inkubiert wurden, wie sie versuchsbedingt durch die Okadasäure in die Kultur eingebracht werden. Aufgetragen wurden pro Spur 1.5×10^6 Zellen. Als Vergleich dienen 2.5×10^4 RV-SMC-Zellen (RV). Diese besitzen Lamin A (70 kDa-Bande) und Lamin C (60 kDa-Bande).

Vergleicht man den zeitlichen Verlauf mit dem Ergebnis aus der Immunfluoreszenzmikroskopie (Abb.4.7) bleibt dort noch ein Teil des Fluoreszenzsignals zu sehen. Erst nach sechs Stunden ist keine Fluoreszenz von Lamin C2 mehr sichtbar. Da auf Gefrierschnitten schon im Diplotän die Signalstärke von Lamin C2 abnimmt (Alsheimer und Benavente, 1996), läßt sich vermuten, daß Lamin C2 zum Zeitpunkt der Auflösung der Kernhülle nicht mehr Bestandteil dieser ist.

4.3.3 Das Schicksal weiterer Kernhüllenproteine beim Übergang zur Metaphase I

Um eine Kontrolle für den Zustand der Kernhülle zu haben, wurden weitere Kernhüllenproteine in die Untersuchungen mit einbezogen.

Zahlreiche Versuche an Oozyten von *Xenopus laevis* sowie in vitro Versuche mit Eiextract wurden durchgeführt, um die Notwendigkeit einzelner Bestandteile der Kernhülle oder des Zyto- bzw. Nukleoplasma für den Zusammenbau der Kernhülle, die Bindung des Chromatins oder die Induzierung der meiotischen Teilung zu analysieren (Burke und Gerace, 1986; Gant et al., 1999; Übersicht in Gant und Wilson, 1997).

Von einigen anderen Komponenten der Kernhülle wie LAPs2 und Lamin B1 ist zumindest aus der Mitose bekannt, daß diese Proteine mit Auflösung der Kernhülle hyperphosphoryliert werden (Yang et al., 1997a; Ottaviano und Gerace, 1986; Peter et al., 1990). Diese Hyperphosphorylierung stellt sich im Western Blot durch einen Bandenshift dar, das heißt das Protein läuft langsamer im SDS-PAGE. LAP2 β und LAP2 γ bleiben nach Auflösung der Kernhülle über ihre Transmembrandomänen mit Membranvesikeln verbunden, während LAP2 α in Lösung geht. Während der Mitose verbleibt Lamin B1 etwa zur Hälfte über seine hydrophobe Farnesylgruppe an diese Vesikel gebunden, während das übrige Lamin B1 in Lösung geht (Yang et al., 1997a).

Da das SC-Protein SCP3 schon von Tarsounas et al. (1999) unter den gleichen Versuchsbedingungen untersucht wurde, dient es als Kontrolle.

Die kultivierten Spermatozyten (siehe unter 4.4.1) wurden geerntet und mit einem Niedrigsalz-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.4) extrahiert, fraktioniert und getrennt als Pellet und Überstand auf ein denaturierendes SDS-Page aufgetragen. Für LAPs2 wurden insgesamt 2×10^5 Zellen, für Lamin B1 1×10^6 Zellen, für SCP3 1×10^6 Zellen und für Lamin C2 3×10^6 Zellen eingesetzt.

In Blot A (Abb. 4.9) erkennt α -SCP3 wie schon von Tarsounas et al. 1999 beschrieben in frisch isolierten Pachytänspermatozyten zwei Banden im Pellet. Neben der starken Bande bei 30 kDa wird noch eine schwache Bande bei 33 kDa sichtbar (vergleiche auch Lammers et al., 1995).

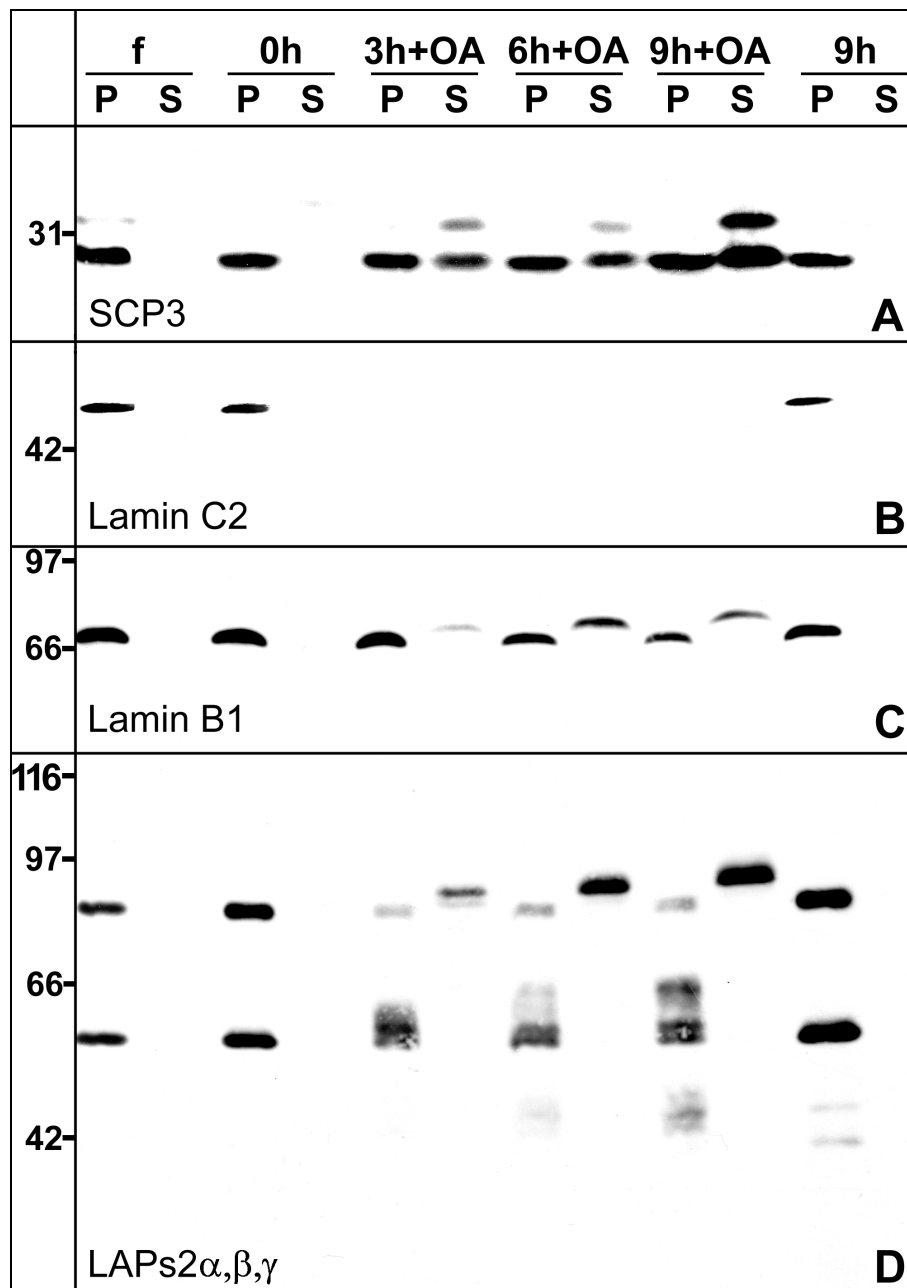


Abb.4.9: Verhalten verschiedener Proteine der Kernhülle am Ende von Prophase I. P: Pellet; S: Überstand; f: frisch isolierte Pachytänspermatozyten; 0h: Zellen direkt nach der ÜN-Kultur geerntet, unbehandelt; 3h+OA: ÜN-Kultur, drei Stunden mit 10 μ M Okadasäure inkubiert; 6h+OA: ÜN-Kultur, sechs Stunden mit 10 μ M Okadasäure inkubiert; 9h+OA: ÜN-Kultur, neun Stunden mit 10 μ M Okadasäure inkubiert; 9h: Kontrolle, ÜN-Kultur, zusätzlich neun Stunden ohne Okadasäure inkubiert.

Nach der ÜN-Kultur werden zeigen die Zellen keine Veränderung. Nach drei Stunden Inkubation mit Okadasäure zeigen sich zusätzlich im Überstand eine starke 30 kDa-

Bande und eine schwächere 33 kDa-Bande. Nach neun Stunden sind beide Banden im Überstand gleich stark.

Bei den Kontrollzellen ohne Okadasäureinkubation finden sich ausschließlich die kräftige Bande bei 30 kDa und eine kaum sichtbare bei 33 kDa im Pellet.

Die 52 kDa-Bande von Lamin C2 ist in Blot B nur in frisch isolierten und unbehandelten Zellen im Pellet vorhanden. Die Dauer der Kultur hat keinen Einfluß auf die Existenz von Lamin C2, wie die Kontrolle nach neun Stunden beweist. Nach der Inkubation mit Okadasäure verschwindet diese Bande endgültig.

Lamin B1 (Blot C) ist zum Zeitpunkt 0 Stunden als Einzelbande im Pellet mit 68 kDa nachweisbar. Nach drei Stunden Inkubation mit Okadasäure läßt sich ein kleiner Teil von Lamin B1 extrahieren. Die schwache Bande liegt auf der Höhe von etwa 70 kDa. Mit zunehmender Inkubationszeit nimmt der extrahierbare Anteil von Lamin B1 zu. Die Kontrollzellen zeigen auch nach neun Stunden nur die 68 kDa-Bande im Pellet.

In Blot D sind die drei Splicingvarianten von dem Lamina-assoziierten Protein 2 (LAPs2) markiert. Die Varianten, die bei 84 kDa (LAP2 α), 58 kDa (LAP2 β) und 40 kDa (LAP2 γ) im Gel laufen, zeigen unterschiedliche Veränderungen durch den Einfluß der Okadasäure. LAP2 γ kommt nur in sehr geringen Mengen in Pachytänspermatozyten vor. LAP2 α befindet sich im Pellet, wird aber nach der Inkubation mit Okadasäure extrahierbar. Nach neun Stunden ist kaum noch etwas im Pellet zurückgeblieben, sondern fast vollständig unter schrittweiser Abnahme der Mobilität in den Überstand gewechselt. Die Kontrolle zeigt nach neun Stunden keine Veränderung gegenüber den frisch isolierten Zellen.

LAP2 β und LAP2 γ zeigen im Laufe der Inkubation mit Okadasäure ebenfalls eine starke, schrittweise Verringerung der Mobilität im Gel, aber sie verbleiben dennoch im Pellet.

Das unterschiedliche Verhalten von LAP2 β und γ bzw. LAP2 α würde sich durch die Anwesenheit bzw. das Fehlen der Transmembrandomäne erklären lassen, so daß nur LAP2 α während der Auflösung der Kernhülle extrahierbar wäre, während LAP2 β und γ zusammen mit den Membranen in der unlöslichen Fraktion verblieben, an die sie durch diese Transmembrandomäne gebunden sind.

4.3.4 Auswirkungen auf LAPs2 nach vorzeitigem Entfernen der Okadasäure

In der Mitose wird der Eintritt der Metaphase durch die Aktivierung des sogenannten Metaphase-promoting-Faktor (MPF) induziert. Nach Überschreiten eines Schwellenwertes setzt eine Kaskade ein. Um zu testen, ob die Okadasäure ebenfalls eine solche Kaskade in den Pachytänspermatozyten auslöst, wurden vier Stunden mit Okadasäure inkubierte Zellen gewaschen und ohne Okadasäure weiter inkubiert. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, um sicher zu gehen, daß schon ein Großteil der Zellen (siehe auch Abb.4.7 zum Vergleich) nachweisbare Veränderungen aufwies. Als Kontrolle wurden weitere Zellen nach dem Entfernen der Okadasäure wieder neu mit Okadasäure behandelt, um vergleichbare Bedingungen zu erhalten. Da Vorversuche gezeigt hatten, daß nach ca. neun Stunden keine weiteren Veränderungen auftraten, wurden neun Stunden mit Okadasäure inkubierte Zellen als absoluten Endpunkt eingesetzt.

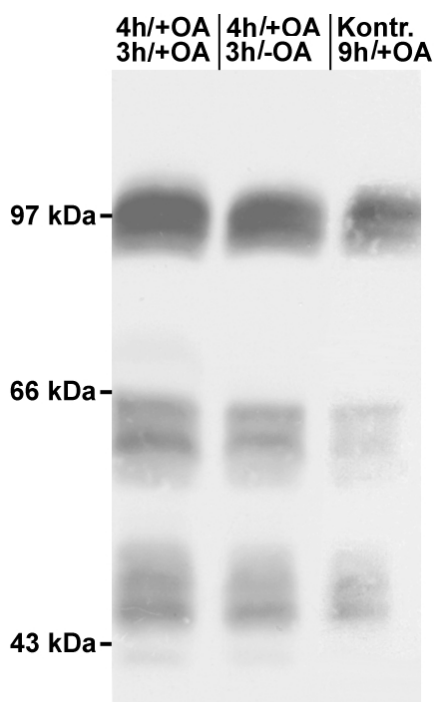


Abb.4.10: Drei Kultur ansätze werden mit 10µM Okadasäure inkubiert. Bei Ansatz 1 und 2 werden die Zellen gründlich gewaschen und mit frischem Medium mit (Ansatz 1) und ohne Zusatz (Ansatz 2) weiter inkubiert. Nach insgesamt sieben Stunden werden die Zellen geerntet. Als weitere Kontrolle dient Ansatz 3, der bis neun Stunden fortgesetzt wurde. Pro Spur wurden 1×10^5 Zellen aufgetragen.

Die beobachteten Verzögerungen stimmen trotz unterschiedlicher Kulturbedingungen überein. Das Verhalten der LAPs2 der Pachytänspermatozyten, die nur vier Stunden mit Okadasäure inkubiert worden sind, stimmt mit denen die bis zu neun Stunden der Wirkung der Okadasäure ausgesetzt waren, überein. Vergleicht man damit das Laufverhalten der LAPs2-Varianten im SDS-PAGE aus Abb. 4.9, wird deutlich, daß auch nach dem Entfernen der Okadasäure die Proteine weiteren Modifikationen unterworfen waren. Nach drei- bzw. sechsstündiger Inkubationszeit ist das Laufverhalten der einzelnen Modifikationsstufen der LAPs2-Varianten noch nicht mit dem nach neun Stunden identisch.

Die Stärke der Banden insgesamt läßt nach neun Stunden nach, da zu diesem Zeitpunkt ein Teil der Zellen nach Auflösung der Kernhülle besonders fragil ist und so bei der Präparation etwas Material verloren geht.

Die Wirkung des Phosphatasehemmers Okadasäure läßt sich unter diesen Kulturbedingungen nicht umkehren. Nach vier Stunden Inkubation mit Okadasäure sind die Modifikationen von LAPs2 endgültig und entsprechen denen, die nach neun Stunden erreicht sind. Dieses stützt die Theorie, daß nach Überschreiten eines Schwellenwertes durch Hemmung der Proteinphosphatasen 1 und 2a die Kinasen die vorzeitige Beendigung der Prophase unter Auflösung der Kernhülle einleiten.

4.4 Expression von Lamin C2 in somatischen Zelllinien und die Auswirkung auf die Stabilität des Zellkerns somatischer Zellen

Da der verkürzte Aminoterminus von Lamin C2 stark konservierte Bereiche betrifft, die sowohl an der Dimerisierung als auch an der Polymerisation des Proteins mit weiteren Bestandteilen der Kernlamina beteiligt sind, sollen folgenden Expressionsstudien in somatischen Zellen zeigen, ob und wie diese verkürzte Variante in die Kernlamina somatischer Zellen eingebaut wird.

4.4.1 Expression von EGFP, Lamin C2-EGFP und Lamin C-EGFP in somatischen Zellen.

Die cDNA von Lamin C2 aus Ratte (Alsheimer et al, 1996) und die cDNA des humanen Lamin C (Lin und Worman, 1993) wurden in den EGFP-Vektor (pEGFP-N2, Clontech) kloniert. EGFP steht für enhanced green fluorescent protein und kann als cDNA über einen Vektor direkt an das carboxyterminale Ende eines zu exprimierenden Proteins kloniert werden. Für die folgenden Versuche wurde das EGFP mit dem Carboxyterminus von Lamin C2 bzw. Lamin C fusioniert. Das exprimierte EGFP erzeugt durch die Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm selbst eine grüne Fluoreszenz. Als Kontrolle wird unfusioniertes EGFP eingesetzt. Exprimiert wurden die Proteine in COS-7-Zellen, die sich gut transfizieren lassen und verglichen mit anderen Zelllinien wie RV-SMC oder NIH 3T3 höhere Transfektionsrate zeigen.

Die Antikörper für die Doppellokalisation wurden mit einem Texas-Red-gekoppelten sekundärer Antikörper inkubiert.

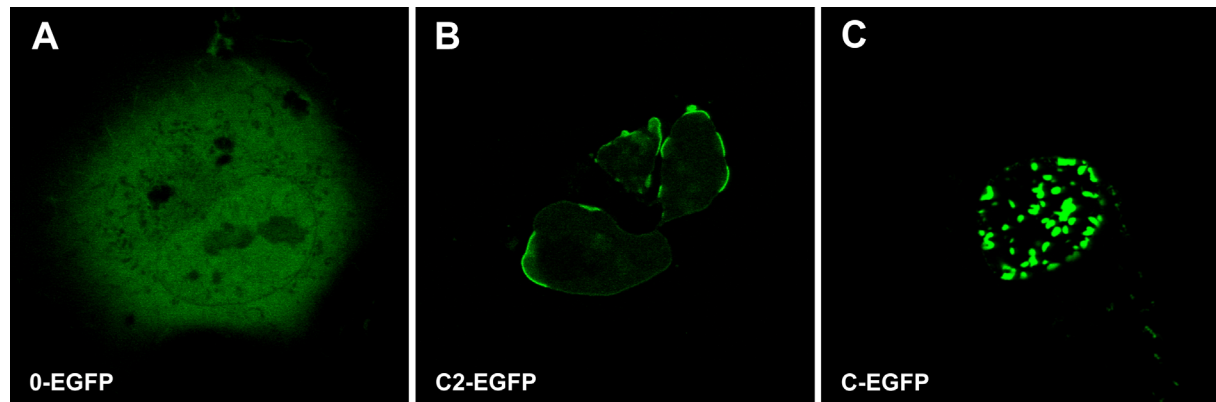


Abb.4.11: Vergleich von EGFP-, Lamin C2-EGFP- und Lamin C-EGFP-Expression in COS-7-Zellen. A: eine mit EGFP-transfizierte Zelle als Kontrolle; B: eine mit Lamin C2-EGFP transfizierte Zelle; C: eine mit Lamin C-EGFP transfizierte Zelle. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion aufgenommen (konfokales-Laser-Scanning-Mikroskop).

Als Kontrolle wurde zunächst EGFP alleine exprimiert (Abb.4.10 A). EGFP ist ein kleines Protein, daß frei in der ganzen Zelle diffundiert. Dadurch sind die transfizierten COS-7-Zellen in ein diffuses Grün getaucht. Der Zellkern hebt sich nur schwach vom Hintergrund ab. Eine Anreicherung der EGFP-Fluoreszenz läßt sich in keinem Zellkompartiment ausmachen.

Im Vergleich dazu ist Lamin C2-EGFP (Abb.4.10 B) ausschließlich im Bereich der Kernhülle lokalisiert. Es ist aber nicht die gesamte Kernhülle markiert, sondern nur einzelne Bereiche zeigen eine grüne Fluoreszenz.

Das Lamin C-EGFP (Abb.4.10 C) akkumuliert in kleinen rundlichen bis spindelförmigen Aggregaten. Diese sind innerhalb des Zellkerns lokalisiert, ohne sich in die Kernhülle zu integrieren. Das Zytoplasma ist frei von diesen Aggregaten.

Betrachtet man Lamin C-EGFP, wird deutlich, daß die Interphase-Zellen nicht in der Lage ist, zusätzliches Lamin C in die Kernhülle zu integrieren. Lamin C bildet Aggregate im Nukleoplasma. Dieses Verhalten ist mit den Ergebnissen von Pugh et al. kompatibel, die schon 1997 zeigen konnten, daß während der Interphase Lamin C Lamin A für seinen Einbau in die Kernhülle benötigt.

Anders sieht es aus mit Lamin C2-EGFP. Dieses Fusionsprotein aggregiert innerhalb der Kernhülle. Dieses ist nur möglich, wenn ein Kernlokalisationsignal und ein Targetingsignal für die Kernhülle vorhanden ist, das das Protein zu der Kernhülle lotst. Das NLS ermöglicht den Transport in Nukleoplasma, aber wie Lamin C2 mit der Kernhülle interagiert und sich in die Kernhülle einbaut, läßt sich damit noch nicht erklären.

4.4.2 Vergleich des Expressionsmusters von Lamin C2 mit und ohne EGFP

Um zu untersuchen, ob die Fusionierung mit EGFP die Assoziation von Lamin C2 mit der Kernhülle beeinträchtigt, wurde Lamin C2 im pcDNA3-Vektor und Lamin C2-EGFP im EGFP-N2-Vektor in zwei parallelen Ansätzen exprimiert. Zum Vergleich für die Verteilung der A-Typ-Lamine in vivo dienen nicht transfizierte Zellen als Kontrolle. Als Sekundärantikörper für R27 wurde ein Texas-Red-gekoppelter Antikörper gegen IgM aus Maus eingesetzt.

In Kontrollzellen (Abb.A) erkennt R27 die A-Typ Lamine A und C in der Kernperipherie von somatischen Zellen. Die Zellen zeigen eine gleichmäßige Markierung in der Kernperipherie.

In den mit Lamin C2 transfizierten Zellen (Abb.B) markiert der Antikörper R27 die Kernperipherie der Zellen und besonders kräftig in die Kernhülle integrierte

Aggregate. Eine Unterscheidung von somatischen A-Typ Laminen und dem meiose-spezifischen Lamin C2 ist in diesem Versuch nicht möglich.

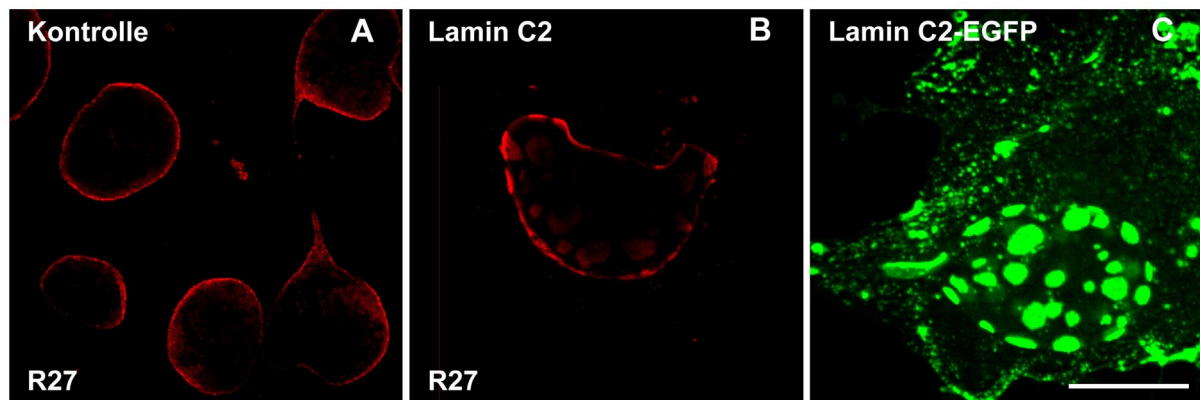


Abb.4.12: Vergleich von exprimiertem Lamin C2 mit dem Lamin C2-EGFP-Fusionsprotein in COS-7-Zellen. A: Immunfluoreszenz mit R27 gegen A-Typ Lamine auf unbehandelten COS-7-Zellen; B: Immunfluoreszenz mit R27 gegen A-Typ Lamine in mit Lamin C2 transfizierten COS-7-Zellen; C: EGFP-Fluoreszenz des Lamin C2-EGFP-Fusionsproteins in transfizierten Zellen. Balken: 10µm

Das Lamin C2-EGFP-Fusionsprotein lokalisiert in Aggregaten innerhalb der Kernperipherie von COS-7-Zellen (Abb.C). Diese ähneln denen, die neben der gleichmäßigen Markierung zusätzlich in der Kernperipherie von COS-7-Zellen in Abb. B auftreten. Die cDNA von Lamin C2-EGFP im pEGFP-N2 Vektor wird in den meisten Zellen stärker exprimiert als die cDNA von Lamin C2 im pcDNA3-Vektor. Die Größe und Anzahl der Aggregate korrelieren mit der eingesetzten Plasmidmenge und der Dauer der Transfektion. Das Stadium der Expression von Lamin C2 in Abb.B entspricht der von Lamin C2-EGFP in Abb.4.10 B. Die Intensität der Fluoreszenz von EGFP ist ungleich stärker als die anderer Fluoreszenzfarbstoffe. Daraus folgt, daß EGFP keine nachweisbare Auswirkung auf das Verhalten von Lamin C2 in COS-7-Zellen zu haben scheint.

4.4.3 Vergleich der Lokalisationen von Lamin B2 mit Lamin C2-EGFP bzw. C-EGFP in COS-7-Zellen

Lamin B2, das wie Lamin B1 kontinuierlich verteilt in der Kernhülle somatischer Zellen lokalisiert ist, wird als Referenz benutzt, um zu untersuchen, ob Lamin C2 und

Lamin C die Strukturintegrität der Kernlamina nachhaltig beeinflussen. In der Doppellokalisierung wurde der mAk X223 (Höger et al., 1990), der Lamin B2 spezifisch ist, zu dessen Lokalisation eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurde ein Texas-Red-gekoppelter Antikörper verwendet.

5. Diskussion

5.1 Lamin C2 ist innerhalb der Kernhülle von Spermatozyten lokal angereichert

Das in dieser Arbeit untersuchte nukleäre Intermediärfilamentprotein Lamin C2 der Ratte, das Bestandteil der Kernlamina in Pachytänspermatozyten ist, ist das erste Beispiel für ein Protein der Kernhülle, daß in der Region der Attachment Plaques angereichert ist. Damit eröffnet sich erstmals die Möglichkeit, die SC-Anheftungsstellen auf molekularer Ebene zu untersuchen, denn stets finden sich im Anheftungsbereich der SC-Enden Lamin C2-Anreicherungen innerhalb der Kernhülle wie die Koloalisationen in der konfokalen Mikroskopie und der Lamin C2-Lokalisation in der Elektronenmikroskopie belegen. Da die Paarung und Synapsenbildung mit umfangreichen Bewegungen der angehefteten SC-Enden während der Prophase (Parvinen und Söderström, 1976; Scherthan et al., 1996; 1998; Bass et al., 1997; Übersicht in Dresser, 1987) einhergeht, ist ein vorübergehender lokal begrenzter Umbau der Kernhülle denkbar. Die für Lamine bisher einzigartige diskontinuierliche Verteilung innerhalb der Kernhülle erhebt Lamin C2 somit zum Kandidaten für eine spezielle Interaktion eines Kernhüllenproteins mit den SC-Enden.

Auch wenn in Immunfluoreszenzlokalisationen SCP3 mit der Kernhülle zu koloalisieren scheint - im Bereich der Attachmentplaques sind die Signale oft besonders kräftig - (siehe Ergebnisse; Heyting et al., 1987; Moens et al., 1987; Heyting, 1996), ist bisher nicht bekannt, welche chromosomalen Proteine mit der Kernhülle interagieren. Die coiled coils versetzen SCP3 *in vivo* in die Lage, über seine α -helikale Stabdomäne filamentöse Strukturen zu bilden (Yuan et al., 1998). Ob und inwieweit es dadurch eine Interaktion z.B. mit Lamin C2 stattfinden kann, ist derzeit vollkommen offen. Ob weitere Bestandteile der SC's wie SCP1, SCP2, SC48 oder weitere bisher unbekannte Proteine an einer Interaktion von SC-Enden mit der Kernhülle beteiligt sind (Meuwissen et al., 1997; Liu et al., 1996; Offenberg et al., 1998; Smith und Benavente, 1992; Tarsounas et al., 1997), ist ebenso wenig bekannt.

Die Ursache für diese inhomogene Verteilung von Lamin C2 ist sehr wahrscheinlich

in seiner eigenen Struktur und weniger in der Zusammensetzung der meiotischen Kernhülle zu suchen, da die Transfektionsexperimente zeigen, daß Lamin C2 als Fusionsprotein auch innerhalb einer somatischen Kernhülle vergleichbare Aggregate ausbildet. Lamin C, das außer der für die Kernlokalisation notwendigen CaaX-Box noch alle in Laminen konservierten Sequenzabschnitte besitzt, die in die Dimerisierungs- und Polymerisierungsprozesse involviert sind, zeigt *in vivo* und ektopisch als Fusionsprotein in somatischen Zellen exprimiert stets eine kontinuierliche Verteilung.

Wie jedoch *in vivo* die einzelnen Laminakomponenten interagieren, d.h. ob z.B. Lamin A mit Lamin C ein Heterodimer bildet und wie die Bindungspartner zusammenkommen ist noch nicht geklärt (Moir et al., 2000a). So konnte eine im Modellversuch entstandene parakristalline Struktur aus überexprimiertem Lamin *in vivo* nicht nachgewiesen werden (Gieffers und Krohne, 1991; Krohne, 1998).

Die über mehrere Tage dauernden Transfektionsversuche mit überexprimiertem Lamin C2 führten nach etwa drei Tagen zum Zelltod, denn die Lamin C2-reichen Bereiche innerhalb der Kernhülle somatischer Zellen nahmen mit der Zeit deutlich an Größe zu und schienen an diesen Stellen die Kernhülle zunehmend zu deformieren. Somit scheint eine Interaktion von Lamin C2 mit der endogenen Lamina die Struktur der Kernhülle so nachhaltig zu stören bis diese schließlich zusammenbricht.

Wie die Expression von Lamin C2 in meiotischen Zellen reguliert wird, könnte ebenfalls zur Klärung der zeitlichen Abläufe während der Prophase I beitragen, die, soweit bekannt, im Folgenden beleuchtet werden.

In diesem Zusammenhang stellt sich ebenfalls die Frage nach der Rolle des meiosespezifischen Lamin B3. Diesem fehlt wie Lamin C2 ebenfalls das aminoterminal Ende der auch in B-Typ Laminen wichtigen α -helikalen Domäne sowie die benachbarte Phosphorylierungsstelle (Ser16) (Furukawa und Hotta, 1993). Ob dieses in Zusammenhang mit einer Heteromer- und oder Polymerbildung steht, ist bisher reine Spekulation.

5.2 Lamin C2 besitzt ein für Lamine neuartiges Membran-Adressierungs-Signal

Anders als bei den übrigen Laminen A, B1, B2 und B3 fehlt Lamin C2 die carboxyterminal-gelegene CaaX-Box (Holtz et al., 1989; Firmbach-Kraft und Stick, 1993; Übersicht in Moir et al., 1995), deren Isoprenylierung und

Carboxymethylierung im Verlauf der posttranslationalen Reifung die Kontaktaufnahme mit der inneren Kernmembran vermittelt (Chelsky et al., 1987, 1989; Hancock et al., 1989, 1991; Farnsworth et al., 1989; Beck et al., 1990). Die Interaktion der Farnesylgruppe mit der Kernmembran setzt einen NLS („nuclear localization signal,-) -gesteuerten Kerntransport voraus (Vergleiche Targeting von ras-Proteinen in die Zytoplasmamembran, Hancock et al., 1991).

Statt der CaaX-Box konnte bei Lamin C2 eine für Lamine bisher einmalige nur sechs Aminosäuren lange aminoterminal gelegene Sequenz als Targetingsequenz, auch Membran-Adressierungs-Signal genannt, ausgemacht werden (GNAEGR). Die Sequenz dieses Hexapeptids ließ vermuten, daß es sich hierbei um eine Myristylierungsstelle handelt. Notwendige Voraussetzungen hierfür sind ein Glycin an Position 1 (nach Abspaltung des Startmethionins), das durch die Myristinsäure modifiziert wird, Position 2 darf dabei nicht von Prolin, einer geladenen oder sperrigen hydrophoben Aminosäure eingenommen werden. Positionen 3 und 4 können von beliebigen Aminosäuren besetzt werden, wohingegen an Position 5 Prolin, große hydrophobe oder geladene Aminosäuren sich sehr ungünstig auf eine Myristylierung auswirken. An Position 6 darf sich vor allem kein Prolin befinden. Daß es sich tatsächlich im Falle von dem Hexapeptid GNAEGR um eine Myristylierungsstelle handelt, konnte kürzlich durch eine massenspektrometrische Analyse von Lamin C2 belegt werden (Alzheimer et al., 2000).

Myristinsäure ist eine seltene, gesättigte C14-Fettsäure, die aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften eine Assoziation des modifizierten Proteins mit einer Membran vermitteln kann (Übersichten in Towler et al., 1988; Resh; 1999). Im Gegensatz zur isoprenylierten CaaX-Box von Lamin A bleibt die Myristylierung bei den modifizierten Proteinen jedoch erhalten (Übersichten in Resh, 1999, Krauss, 1997).

Diese Myristylierung erklärt jedoch noch nicht, wie es zum permanenten Einbau in die Kernhülle kommt, da mit dem N-Terminus der Teil des Proteins fehlt, der bei den somatischen Laminen notwendig für den Einbau in die Lamina ist (siehe Abb.4.11, Abb.4.12).

5.3 Lamin C2 läßt sich am Ende der meiotischen Prophase nicht mehr nachweisen

Lamin C2 tritt nach bisherigen Erkenntnissen (Alsheimer und Benavente, 1996) seit dem Zygotän in Erscheinung und ist im Pachytän ständig nachweisbar. Zum Ende des Diplotän ist es kaum noch detektierbar. Aufgrund technischer Restriktionen konnte der Nachweis des Auftretens und Verschwindens bisher nur anhand von Gefrierschnitten des Hodengewebes (vergleiche Abb.4.1) erfolgen.

Über eine Modifikation durch Phosphorylierung wie sie für andere Komponenten der Kernhülle, z.B. LAPs2, p58 und Lamin B1 (Yang et al., 1997a; Nikolakaki, 1996; Worman et al., 1988b) in mitotischen Zellen beschrieben wurde, ist bei Lamin C2 nichts bekannt. Da LAPs2 und Lamin B1 sowohl in meiotischen wie auch mitotischen Zellen vorkommen, stellen diese eine gute Referenz für den zeitlichen Ablauf während der ersten meiotischen Teilung dar.

Während in der Mitose die erwähnten Kernhüllenproteine phosphoryliert werden, gehen sie teilweise in Lösung oder bleiben an Membranvesikel gebunden (Yang et al., 1997a; Laskey et al., 1996; Übersicht in Gerace und Foisner, 1994, Gerace und Burke, 1988), um beim anschließenden Neuaufbau der Kernhülle wieder eingebaut zu werden. Damit kommt ihnen möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Organisation bzw. Reorganisation von Kernhülle und Chromatin zu (Nigg, 1992; Moir et al., 1995; Lourim und Krohne, 1994; Marshall und Wilson, 1997; Gant und Wilson, 1997). LAPs2 und Lamin B1 zeigen in den meiotischen Prophase I-Zellen biochemische Eigenschaften vergleichbar denen in somatischen Interphase-Zellen (Alsheimer et al., 1999). Die hier vorgelegten Ergebnisse deuten darauf hin, daß gegen Ende der Prophase I die Proteine Modifizierungsprozessen unterworfen sind, wie es für diese Proteine schon in somatischen Zellen gezeigt worden ist (Ottaviano und Gerace, 1986; Yang et al., 1997a; siehe Ergebnisteil), d.h. mit dem Ende der Prophase I und der folgenden Auflösung der Kernhülle verringert sich die Laufgeschwindigkeit beider Proteine im Gel und ein Teil von Lamin B1 und die Splicingvariante LAPs2 α gehen in zunehmendem Maße bei einer Nidrigsalzextraktion in die lösliche Phase über. Lamin C2 jedoch ist zu dem Zeitpunkt als bei den anderen Kernhüllenproteinen erster Veränderungen auftreten, aber die Kernhülle noch intakt scheint, nicht mehr nachweisbar. Die Signale von Lamin C2 in der Immunfluoreszenzmikroskopie scheinen diesen Befund ebenfalls zu

stützen. Ob es sich um den ubiquitin-abhängigen (Übersicht in Ciechanover, 1994; Haas und Bright, 1985; Mitchell et al., 1991), p53-abhängigen (Odorisio et al., 1998) oder einen andersartigen Abbauweg handelt, muß derzeit noch offen bleiben.

Dem gegenüber steht das Verhalten eines möglicherweise mit der Kernhülle interagierende meiosespezifischen Proteins, SCP3, das nach dem Ablösen der Chromosomenenden teilweise noch mit den Chromosomen bis nach der Metaphase I verbunden bleibt (Tarsounas et al., 1997, 1999). Das Protein SCP3, für das schon Lammers et al. 1995 mindestens 24 Phosphorylierungsvarianten während der Prophase I nachgewiesen haben, zeigt beim Übergang zur Metaphase I neben den vorherrschenden 30 und 33 kDa Banden auch bedeutende Proteinmengen in der löslichen Phase und einen langsamere Laufgeschwindigkeit in Richtung 33 kDa-Bande (von Glasenapp und Benavente, 2000). Mit Auflösung der Synapse beim Übergang zur Metaphase I nimmt sein Signal in der Immunfluoreszenzmikroskopie ab.

Die bisherige Vermutung, daß ein Gleichgewicht von Kinasen und Phosphatasen die Prophase I aufrechterhält, wird durch die hier dargestellten Versuche mit dem Phosphatasehemmer Okadasäure (Suganuma et al., 1988; Haystead et al., 1989; Picard et al., 1989) weiter untermauert. Eine Beteiligung an der Auflösung der Kernhülle in der Mitose wurde für die cdc2-Kinase, auch als p34cdc2-Kinase bezeichnet, nachgewiesen, die ebenfalls in meiotischen Prophase I-Zellen vorhanden ist (Tarsounas et al., 1999). Diese wird durch Dephosphorylierung durch die CDC25C-Proteinphosphatase aktiviert und kann so einen Komplex mit Cyclin B1 bilden, der als metaphase-promoting factor (MPF) für den Eintritt in die Metaphase eine Schlüsselrolle spielt und mit einer metaphase-spezifischen Phosphorylierung der Lamine einhergeht (Peter et al., 1990, 1991). Cobb et al. zeigten 1999, daß während der gesamten meiotischen Prophase I sowohl p34cdc2 als auch Cyclin B1 in bedeutenden Mengen vorhanden sind, wohingegen CDC25C-Kinase erst ab dem Pachytän zusammen mit dem meiosespezifischen Histon H1t auftritt. Da in frühen Pachytänspermatozyten die Okadasäure allerdings keine Wirkung zeigt, werden neben MPF noch weitere Faktoren für eine Transition in die Metaphase I benötigt, die aber deutlich vor dem natürlichen Ende der Prophase I zur Verfügung stehen.

Im Vergleich mit weiteren Kernhüllenproteinen sinkt die Menge an Lamin C2 noch vor dem Auflösen der Kernhülle sowie den umfangreichen Veränderungen der anderen untersuchten Proteine.

Aussicht

Das in dieser Arbeit untersuchte meiosespezifische A-Typ Lamin, Lamin C2, eröffnet neue Perspektiven hinsichtlich der Bewegung der SC-Enden innerhalb der Kernhülle. Da die α -helikale Domäne dieses Lamins gegenüber den somatischen Varianten kürzer ist, müssen neue Polymerisierungsstudien Aufschluß darüber geben, ob und wie Lamin C2 in der Lage ist, Homo- oder Heterodimere mit anderen Laminen zu bilden. Da Lamin C2 Teil einer größeren Struktur ist, müssen parallel stets alle möglichen Interaktionen mit den übrigen Kernlaminakomponenten im Blick behalten werden. Besonders interessant dürfte aber in diesem Zusammenhang die Untersuchung der Lokalisation und der Eigenschaften von Lamin B3 sein, dessen α -helikale Domäne ebenfalls verkürzt ist. Eine Koloalisation gäbe Aufschluß über eine mögliche Interaktion beider Proteine. Aber auch weitere bisher unbekannte Bindungspartner innerhalb der Kernhülle und dem Nukleoplasma könnten zur Klärung der SC-Anheftung und der gerichteten Chromosomenbewegung beitragen. Die Suche nach möglichen Bindungspartnern von Lamin C2 im Zusammenhang mit den Synaptonemalkomplexenden scheint der Schlüssel zu seiner Funktion zu sein. Ob Lamin C2 an der Bewegung der SC-Enden zum Zeitpunkt ihrer Anheftung an die Kernhülle beteiligt ist (Sawin und Endow, 1993; Sperry und Zhao, 1996), erfordert eine schlüssige Erklärung über die Antriebskraft der Chromosomenbewegung während der meiotischen Prophase I.

6.1 Zusammenfassung

In der Kernlamina von Spermatozyten von Nagetieren sind die Lamin A-Genprodukte, Lamin A und C, durch eine meiosespezifische Splicingvariante ersetzt. Dieses Lamin C2 unterscheidet sich auffallend von den somatischen Varianten in Struktur, Menge und Verhalten. Durch eine ektopische Expression von Lamin C2 als EGFP-Lamin C2-Fusionsprotein in einer somatischen Zelllinie zeigte sich, daß eine neuartige Hexapeptidsequenz (GNAEGR) am N-terminalen Ende des Proteins anstelle der C-terminal gelegenen CaaX-Box somatischer Lamine für die Interaktion mit der Kernhülle verantwortlich ist. So ermöglicht eine posttranslationelle Myristylierung des ersten Glycins ein Membrantargeting, bei dem der hydrophobe Myristinsäurerest vergleichbar dem hydrophoben Farnesylrest am Cystein der CaaX-Box mit den Fettsäureresten der Kernmembran interagiert. Die Deletion des Hexapeptids im Fusionsprotein EGFP-Lamin C2 und die seine N-terminale Insertion in das Fusionsprotein EGFP-Lamin C - es besitzt keine CaaX-Box - bestätigt, daß allein das Hexapeptid das Membrantargeting steuert: Die Deletionsmutante EGFP-Lamin C2 bleibt diffus im Kern verteilt, während sich die Insertionsmutante EGFP-Lamin C im Bereich der Kernperipherie anreichert.

Eine weitere Besonderheit stellt die Verteilung von Lamin C2 innerhalb der Kernhülle dar, denn es verteilt sich nicht gleichmäßig wie alle bisher bekannten Lamine, sondern bildet zahlreiche Aggregate. Nicht nur in der Kernhülle von Spermatozyten, sondern auch als Fusionsprotein in somatischen Zellen exprimiert, zeigt Lamin C2 diese Akkumulationen. Überraschenderweise treten die Synaptonemalkomplexenden nur im Bereich dieser Lamin C2-Aggregate mit der Kernhülle in Kontakt. Es wird daher postuliert, daß die Lamin C2-Aggregate der lokalen Verstärkung der Kernhülle dienen und wichtig für die auf die Prophase beschränkte Anheftung der SC an die Kernhülle sind. Da zudem in einer Kurzzeitkultur von Pachytänspermatozyten, in der die Prophase künstlich beschleunigt wird, gezeigt werden konnte, daß Lamin C2 mit Ende der Prophase I noch vor dem Auflösen der eigentlichen Kernhülle nicht mehr nachweisbar ist, scheint ein Zusammenhang zwischen Lamin C2 in der Kernhülle und der Umorganisation des genetischen Materials zu bestehen.

6.2 Summary

In the spermatocytes of rodents the lamin A gene products, lamin A and C, are substituted by a meiosis specific splicing variant called lamin C2, which differs significantly in structure, amount and function from somatic lamins. Instead of having a CaaX-Box, which mediates interaction between the somatic lamins and the nuclear membrane, a novel kind of membrane targeting is found in lamin C2. It consists of a hexapeptide sequence (GNAEGR) which substitutes the N-terminus and parts of the α -helical rod domain. Transfection experiments with a EGFP-lamin C2- fusion protein in a somatic cell line showed that without this hexapeptide no membrane targeting of lamin C2 takes place, while an insertion of the hexapeptide enables lamin C to accumulate at the periphery of the nuclear envelope.

The first N-terminal glycine of the hexapeptide is posttranslationally modified by a myristic acid residue whose hydrophobic chain interacts with the nuclear membrane similar to the farnesyl residue in somatic lamins. By looking for the localization in the nuclear envelope lamin C2 reveals another surprising behaviour compared to somatic lamins. While other lamins are distributed evenly in the nuclear envelope, lamin C2 is found in several aggregates. Furthermore, the accumulation is not restricted to the nuclear envelope of spermatocytes, but also found in somatic cells when lamin C2 as EGFP-lamin C2 fusion protein is ectopically expressed. Contrary to somatic cells where no effect of ectopically expressed EGFP-lamin C2 on the organization of chromatin can be seen, in spermatocytes the position of SC-ends colocalize with lamin C2 rich areas of the nuclear envelope without exception.

The N-terminal part of somatic lamins that is missing in lamin C2 contains domains which are involved in dimerization and polymerization of A-type and B-type lamins. Therefore a new way of interaction in the nuclear envelope of spermatocytes has to be proposed for lamin C2.

Additionally, lamin C2 can only be found in spermatocytes during prophase I. A short-time culture which accelerates the development of pachytene spermatocytes by the phosphatase inhibitor Okadaic acid supports the finding that lamin C2 vanishes before the break down of the nuclear envelope in metaphase I begins.

7. Abkürzungen

AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
CDC25C	Cyclin-abhängige Kinase 25 C
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAB	Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
Δ	Deletion
E	Extinktion
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EM	Elektronenmikroskopie
IgG, IgM	Immunglobulin G, Immglobulin M (Antikörperklassen)
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
LAP	Lamina-assoziierte Proteine
LE	Lateralelemente
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
mAK	monoklonaler Antikörper
MPF	metaphase-promoting-factor, maturation-promoting-factor
NLS	Kernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
NPC	Kernporenkomplex
N-Terminus	Aminoterminus
OA	Okadasäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA	Paraformaldehyd
rpm	Umdrehungen pro Minute
SC	Synaptonemalkomplex
SCP	Synaptonemalkomplex-Protein
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
U	Einheit
XY-Body	partiell gepaartes X- und Y-Chromosom

8. Literatur

- ◆ **Aebi, U., Cohn, J., Buhle, L. und Gerace, L. (1986).** The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* **323**:560-564
- ◆ **Alzheimer, M. und Benavente, R. (1996).** Change of karyoskeleton during mammalian spermatogenesis: expression pattern of nuclear lamin C2 and its regulation. *Exp. Cell Res.* **228**:181-188
- ◆ **Alzheimer, M., Fecher, E. und Benavente, R. (1998).** Nuclear envelope remodelling during rat spermiogenesis: and expression pattern of LAP2/thymopoietins. *J. Cell Sci.* **111**:2227-2234
- ◆ **Alzheimer, M., von Glasenapp, E., Hock, R. und Benavente, R. (1999).** Architecture of the nuclear periphery of rat pachytene spermatocytes: distribution of nuclear envelope proteins in relation to the synaptonemal complex attachment sites. *Mol. Biol. Cell* **10**:1235-1245
- ◆ **Alzheimer, M., von Glasenapp, E., Schnölzer, M., Heid, H. und Benavente, R. (2000).** Meiotic lamin C2: The unique amino-terminal hexapeptide GNAEGR is essential for nuclear envelope association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (im Druck)
- ◆ **Ashery-Padan, R., Weiss, A.M., Feinstein, N. und Gruenbaum, Y. (1997).** Distinct regions specify the targeting of otefin to the nucleoplasmic side of the nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* **272**:2493-2499
- ◆ **Ashley, T. (1994).** Mammalian meiotic recombination: a reexamination. *Hum. Genet.* **94**:587-593

- ◆ **Bass, H.W., Marshall, W.F., Sedat, J.W., Agard, D.A. und Cande, W.Z. (1997).** Telomeres cluster de novo before the initiation of synapsis: a three-dimensional spatial analysis of telomere positions before and during meiotic prophase. *J. Cell Biol.* **137**:5-18
- ◆ **Bass, H.W., Riera-Lizarazu, O., Ananiev, E.V., Bordoli, S.J., Rines, H.W., Phillips, R.L., Sedat, J.W., Agard, D.A. und Cande, W.Z. (2000).** Evidence for the coincident initiation of the homolog pairing and synapsis during the telomere-clustering (bouquet) stage of meiotic prophase. *J. Cell Sci.* **113**:1033-1042
- ◆ **Beck, L.A., Hosick, T.J. und Sinensky, M. (1990).** Isoprenylation is required for the processing of the lamin A precursor. *J. Cell Biol.* **110**:1489-1499
- ◆ **Benavente, R., Dabauvalle, M.C., Scheer, U. und Chaly, N. (1989).** Functional role of newly formed pore complexes in post mitotic nuclear reorganization. *Chromosoma* **98**:233-241
- ◆ **Bonne, G. und Di Barletta, M.R. (1999).** Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genet.* **21**:285-269
- ◆ **Burke, B. und Gerace, L. (1986).** A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *Cell* **44**:639-652

- ◆ **Ciechanover, A. (1994).** The ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **79**: 13-21

- ◆ **Chapman, D.L. und Wolgemuth, D.J. (1994).** Regulation of M-phase promoting factor activity during development of mouse male germ cells. *Dev. Biol.* **165**:500-506
- ◆ **Chelsky, D., Olson, J.F., und Koshland, D.E. Jr. (1987).** Cell cycle-dependent methyl esterification of lamin B. *J. Biol. Chem.* **264**:7637-7643
- ◆ **Chelsky, D., Sobotka, C. und O'Neill, C.L. (1989).** Lamin B methylation and assembly into the nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* **264**:7637-7643
- ◆ **Chu, A., Rassadi, R. und Stochaj, U. (1998).** Velchro in the nuclear envelope: LBR and LAPs. *FEBS Lett.* **441**:165-159
- ◆ **Chung, C.T., Niemela, S.L. und Miller, R.H. (1989).** One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:2172-2175
- ◆ **Clements, L., Manilal, S., Love, D.R. und Morris, G.E. (2000).** Direct interaction between emerin and lamin A. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **267**:709-714
- ◆ **Cobb, J., Cargile, B. und Handel, M.A. (1999).** Acquisition of competence to condense metaphase I chromosomes during spermatogenesis. *Dev. Biol.* **205**:49-64

- ◆ **Dabauvalle, M.-C., Müller, E., Ewald, A., Kress, W., Krohne, G. und Müller, C.R. (1999).** Distribution of emerin during the cell cycle. *Eur. J. Cell Biol.* **78**:749-756
- ◆ **Dawe, R.K. Sedat, J.W., Agard, D.A. und Cande, W.Z. (1994).** Meiotic chromosome pairing in maize is associated with a novel chromatin organization. *Cell* **76**:901-912
- ◆ **Dawson, J.F. und Holmes, C.F. (1999).** Molecular mechanisms underlying inhibition of protein phosphatases by marine toxins. *Front. Biosci.* **4**:D646-58
- ◆ **Dechat, T., Gotzmann, J., Harris, C.A., Talle, M.A., Siekierka, J.J. und Foisner, R. (1998).** Detergent-resistance of LAP2 α in interphase nuclei and phosphorylation-dependent association with chromosomes early in the nuclear assembly implies functions in the nuclear structure dynamics. *EMBO J.* **17**:4887-4902
- ◆ **Dechat, T., Vlcek, S. und Foisner, R. (2000).** Review: lamina-associated polypeptide 2 isoforms and related proteins in cell cycle-dependent nuclear structure dynamics. *J. Struct. Biol.* **129**:335-345
- ◆ **Dernburg, A.F., Sedat, J.W., Cande, W.Z. und Bass, H.W. (1995).** Cytology of Telomeres in *Telomeres*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp.295-338
- ◆ **de Rooij, D.G. und Grootegoed, J.A. (1998).** Spermatogonial stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**:694-701
- ◆ **Dessev, G., locheva-Dessev, C., Bischoff, J.R., Beach, D. und Goldman, R. (1991).** A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles nuclei of clam oocytes in vitro. *J. Cell Biol.* **112**:523-533
- ◆ **Dresser, M.E. (1987).** The synaptonemal complex and meiosis: an immuno-cytochemical approach in *Meiosis*, P.B. Moens (Hsg.), academic press, Orlan-do, pp.245-274
- ◆ **Drummond, S., Ferrigno, P., Lyon, C., Murphy, J., Goldberg, M., Allen, T., Smythe, C., Hutchison, C.J. (1999).** Temporal differences in the appearance of NEP-B78 and an LBR-like

- protein during *Xenopus* nuclear envelope reassembly reflect the ordered recruitment of functionally discrete vesicle types. *J. Cell Biol.* **144**:225-240
- ◆ **Duband-Goulet, I., Courvalin, J.C., und Buendia, B. (1998).** LBR, a chromatin and lamin binding protein from the inner nuclear membrane, is proteolyzed at the late stages of apoptosis. *J. Cell Sci.* **111**:1441-1451
 - ◆ **Dyer, J.A., Kill, I.R., Pugh, G., Quinlan, R.A., Lane, B. und Hutchison, C.J. (1997).** Cell cycle changes in A-type lamin associations detected in human dermal fibroblasts using monoclonal antibodies. *Chromosome Res.* **5**:383-394
 - ◆ **Eddy, E.M. und O'Brien, D.A. (1998).** Gene expression during mammalian meiosis. **37**:141-200
 - ◆ **Ellenberg, J., Siggia, E.D., Moreira, J.E., Smith, C.L., Presley, J.F., Worman, H.J., und Lippincott-Schwartz, J. (1997).** Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J. Cell Biol.* **138**:1193-1206
 - ◆ **Emery, A.E. (2000).** Emery-Dreifuss muscular dystrophy - a 40 year retrospective. *Neuromusc. Disord.* **10**:228-232
 - ◆ **Fairley, E.A.L., Kendrick-Jones, J. und Ellis, J.E. (1999).** The Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype arises from aberrant targeting and binding of Emerin at the inner nuclear membrane. *J. Cell Sci.* **112**:2571-2582
 - ◆ **Farnsworth, C.C., Wolda, S.L., Gelb, M.H. und Glomset, J.A. (1989).** Human lamin B contains a farnesylated cysteine residue. *J. Biol. Chem.* **264**: 20422-20429
 - ◆ **Fawcett, D.W. und Chemes, H.E. (1979).** Changes in distribution of nuclear pores during differentiation of the male germ cells. *Tissue Cell* **11**:147-162
 - ◆ **Felice, K.J., Schwartz, R.C. Brown, C.A., Leicher, C.R. und Grunnet, M.L. (2000).** Autosomal dominant Emery-Dreifuss dystrophy due to mutations in the rod domain of the lamin A/C gene. *Neurology* **55**:275-280
 - ◆ **Firmbach-Kraft, I. und Stick, R. (1993).** The role of CaaX-dependent modifications in membrane association of *Xenopus* nuclear lamin B3 during meiosis and the fate of B3 in transfected mitotic cells. *J. Cell Biol.* **123**:1661-1670
 - ◆ **Fisher, D.Z., Chaudhary, N. und Blobel, G. (1986).** cDNA sequencing of the nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filaments proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:6450-6454
 - ◆ **Foisner, R. und Gerace, L. (1993).** Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell* **73**:1267-1279
 - ◆ **Foisner, R. (1997).** Dynamic organization of intermediate filaments and the associated proteins during the cell cycle. *BioEssays* **19**:297-305

- ◆ **Franke, W.W., Schmid, E., Vanderkerckhove, J. und Weber, K. (1980).** A permanently proliferating vascular smooth cell with maintained expression of smooth muscle characteristics, including actin of the smooth muscle type. *J. Cell Biol.* **87**:594-600
- ◆ **Furukawa, K. und Hotta, Y. (1993).** cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *EMBO J.* **12**:97-106
- ◆ **Furukawa, K. und Kondo, T. (1998).** Identification of the lamina-associated-polypeptide-binding domain of lamin B-type. *Eur. J. Biochem.* **251**:729-733
- ◆ **Furukawa, K., Inagaki, H. und Hotta, Y. (1994).** Identification and cloning of an mRNA coding for a germ cell specific A-type lamin in mice. *Exp. Cell Res.* **212**:426-430
- ◆ **Furukawa, K., Panté, N., Aebi, U. und Gerace, L. (1995).** Cloning of a cDNA for lamina-associated polypeptide 2(LAP2) and identification of regions that specify targeting to the nuclear envelope. *EMBO J.* **14**:1626-1636
- ◆ **Furukawa, K., Fritze, C.E. und Gerace, L. (1998).** The major nuclear envelope targeting domain of LAP2 coincides with its lamin binding region but is distinct from its chromatin interaction domain. *J Biol. Chem.* **7**:4213-4219

- ◆ **Gant, T.M., Harris, A.C. und Wilson, K.L. (1999).** Roles of LAP2 proteins in nuclear assembly and DNA replication: Truncated LAP2 β proteins alter lamina assembly, envelope formation, nuclear size, and DNA replication efficiency in *Xenopus laevis* extracts. *J. Cell Biol.* **144**:1083-1096
- ◆ **Gant, T.M. und Wilson, K.L. (1997).** Nuclear assembly. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**:669-695
- ◆ **Geisler, N. und Weber, K. (1981).** Comparison of the proteins of two immunologically distinct intermediate-sized filaments by amino-acid sequence analysis: desmin und vimentin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:4120-4123
- ◆ **Geisler, N. und Weber, K. (1982).** The amino-acid sequence of chicken muscle desmin provides a common structural model for intermediate filament proteins including the wool alpha keratins. *EMBO J.* **1**:1649-1656
- ◆ **Georgatos, S.D. (1994).** Towards an understanding of nuclear morphogenesis. *J Cellul. Biochem.* **55**:69-76
- ◆ **Georgatos, S.D. und Blobel, G. (1987).** Lamin B constitutes an intermediate filament attachment site at the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* **105**:117-125
- ◆ **Gerace, L. und Blobel, G. (1980).** The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* **19**:277-287
- ◆ **Gerace, L. und Burke, B. (1988).** Functional organization of the nuclear envelope. *Ann. Rev. Cell Biol.* **4**:335-74
- ◆ **Gerace, L. und Foisner, R. (1994).** Integral membrane proteins and dynamic organization of the nuclear envelope. *Trends Cell Biol.* **4**:127-131
- ◆ **Gieffers, C. und Krohne, G. (1991).** In vitro reconstruction of recombinant lamin A and a lamin A mutant lacking the carboxy-terminal tail. *Eur. J. Cell Biol.* **55**:191-199

- ◆ **Graham, R.C. und Karnovsky, M.J. (1966).** The early stage of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney : ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* **14**: 291-302
- ◆ **Glass, J.R. und Gerace, L. (1990).** Lamins A and C bind and assemble at the surface of mitotic chromosomes. *J. Cell Biol.* **111**:1047-1057
- ◆ **Glass, C.A., Glass, J.R., Taniura, H., Hasel, K.W., Blevitt, J.M. und Gerace, L. (1993).** The α -helical rod domain of human lamins A and C contains a chromatin binding site. *EMBO J.* **12**:4413-4424
- ◆ **Görlich, D. (1997).** Nuclear protein import. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:412-419

- ◆ **Haas, A.L. und Bright, P.M. (1985).** The immunochemical detection and quantitation of intracellular ubiquitin-protein conjugates. *J. Biol. Chem.* **260**:12464-12373
- ◆ **Haas, M. und Jost, E. (1993).** Functional analysis of phosphorylation sites in human lamin A controlling lamin disassembly, nuclear transport and assembly. *Eur. J. Cell Biol.* **62**:237-247
- ◆ **Hancock, J.F., Magee, A.I., Childs, J.E. und Marshall, C.J. (1989).** All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* **57**: 1167-1177
- ◆ **Hancock, J.F., Cadwallader, K. und Marshall, C.J. (1991).** Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21^{K-ras(B)}. *EMBO J.* **10**: 641-646
- ◆ **Handel, M.A., Caldwell, K.A. und Wiltshire, T. (1995).** Culture of pachytene spermatocytes for analysis of meiosis. *Dev. Genet.* **16**:128-139
- ◆ **Harris, C.A., Andryuk, P.J., Cline, S.C., Natarajan, A., Siekierka, J.J. und Goldstein, G. (1994).** Three distinct human thymopoietins are derived from alternatively spliced mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:6283-6287
- ◆ **Harris, C.A., Andryuk, P.J., Cline, S.C., Mathew, S., Siekierka, J.J. und Goldstein, G. (1995).** Structure and mapping of the human thymopoietin (TMPO) gene and relationship of human TMPO to the rat lamin-associated polypeptide 2. *Genomics* **28**:198-205
- ◆ **Hasenkampf, C.A. (1996).** The SC- the chaperones of crossing over. *Chromosome Res.* **4**:133-140
- ◆ **Haystead, T.A.J., Sim, A.T.R., Carling, D., Honnor, R.C., Tsukitani, Y., Cohen, P. und Hardie, D.G. (1989).** Effects of the tumour promotor okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature* **337**:78-81
- ◆ **Heald, R. und McKeon, F. (1990).** Mutations of phosphorylation sites in Lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* **61**: 579-589
- ◆ **Hecht, N.B. (1995).** The making of a spermatozoon: a molecular perspective. *Dev. Genet.* **16**:95-103
- ◆ **Heitlinger, E., Peter, M., Häner, M., Lustig, A., Aebi, U. und Nigg, E.A. (1991).** Expression of chicken lamin B2 in *Escherichia coli*: characterization of its structure, assembly, and molecular interactions. *J. Cell Biol.* **113**: 485-495

- ◆ **Heng, H.H., Chamberlain, J.W., Shi, X.M., Spyropoulos, B., Tsui, L.C. und Moens, P.B. (1996).** Regulation of meiotic chromatin loop size by chromosomal position. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:2795-2800
- ◆ **Heyting, C. (1996).** Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**:389-396
- ◆ **Heyting, C., Moens, P.B., van Raamsdonk, W., Dietrich, A.J.J., Vink, A.C.G. und Redeker, E.J.W. (1987).** Identification of two major components of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat. *Eur. J. Cell Biol.* **43**:148-154
- ◆ **Höger, T.H., Krohne, G. und Franke, W.W. (1988).** Amino acid sequence and molecular characterization of murine lamin B as deduced from cDNA clones. *Eur. J. Cell Biol.* **47**:283-290
- ◆ **Höger, T.H., Zatloukal, K., Waizenegger, I. und Krohne, G. (1990).** Characterization of a highly conserved B-type lamin present in cells previously thought to contain only a single B-type lamin. *Chromosoma* **99**:379-390
- ◆ **Höger, T.H., Grund, C., Franke, W.W. und Krohne, G. (1991).** Immunolocalization of lamins in the thick nuclear lamina of human synovial cells. *Eur. J. Cell Biol.* **54**:150-156
- ◆ **Holtz, D., Tanaka, R.A., Hartwig, J. und McKeon, F. (1989).** The CaaX motif of lamin A functions in conjunction with the nuclear localization signal to target assembly to the nuclear envelope. *Cell* **59**:969-977
- ◆ **Horton, H., McMorro, I. und Burke, B. (1992).** Independent expression and assembly properties of heterologous lamins A and C in murine embryonal carcinomas. *Eur. J. Cell Biol.* **57**:172-183

- ◆ **Kalderon, D., Richardson, W.D., Markham, D.R. und Smith, A.E. (1984).** Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* **311**: 33-38
- ◆ **Kita, K., Omata, S. und Horigome, T. (1993).** Purification and characterization of a nuclear pore glycoprotein complex containing p62. *J. Biochem. (Tokyo)* **113**:377-382
- ◆ **Klapper, M., Exner, K., Kempf, A., Gehrig, C., Stuurman, N., Fisher, P.A. und Krohne, G. (1997).** Assembly of A- and B-type lamins studied *in vivo* with the baculovirus system. *J. Cell Sci.* **110**: 2519-2532
- ◆ **Kon, Y., Horikoshi, H. und Endoh, D. (1999).** Metaphase-specific cell death in meiotic spermatocytes in mice. *Cell Tissue Res.* **296**:359-369
- ◆ **Kozak, M. (1989).** The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.* **108**:229-241
- ◆ **Krauss, G. (1997).** Membranverankerung und Signalübertragung *in Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*. Weinheim, Wiley-VCH 1997, S. 146-150
- ◆ **Krohne, G. (1998).** 19. Lamin assembly *in vivo*, in *subcellular biochemistry 31: intermediate filaments* (Herrmann und Harris, Hrsg) Plenum Press, New York, 1998
- ◆ **Krohne, G. und Benavente, R. (1986).** The nuclear lamins. *Exp. Cell Res.* **162**:1-10
- ◆ **Krohne, G., Debus, E., Osborn, M., Weber, K. und Franke, W.W. (1984).** A monoclonal antibody against nuclear lamina proteins reveals cell type-specificity in *Xenopus laevis*. *Exp. Cell Res.* **150**:47-59

- ◆ **Krohne, G., Waizenegger, I. und Höger, T.H. (1989).** The conserved carboxy-terminal cysteine of the nuclear lamins is essential for lamin association with the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* **109**:2003-2011
- ◆ **Krohne, G., Stuurman, N. und Kempf, A. (1998).** Assembly of *Drosophila* lamin Dm and C mutant proteins studied with baculovirus system. *Eur. J. Cell Biol.* **77**:276-283
- ◆ **Lammers, J.H.M., van Aalderen, M., Peters, A.H.E.M., van Pelt, A.A.M., Gaemers, I.C., de Rooij, D.G., de Boer, P., Offenbach, H.H., Dietrich, A.J.J. und Heyting, C. (1995).** A change in the phosphorylation pattern of the 30000-33000 Mr synaptonemal complex proteins of the rat between early and mid-pachytene. *Chromosoma* **104**:154-163
- ◆ **Lanford, R.E. und Butel, J.S. (1984).** Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell* **37**: 801-813
- ◆ **Lang, C., Paulin-Levasseur, M., Gajewski, A., Alsheimer, M., Benavente, R. und Krohne, G. (1999).** Molecular characterization and developmentally regulated expression of *Xenopus* lamina-associated polypeptide 2 (XLAP2). *J. Cell Sci.* **112**:749-759
- ◆ **Laskey, R.A., Görlich, D., Madine, M.A., Makkerh, J.P.S. und Romanowski, P. (1996).** Regulatory roles of the nuclear envelope. *Exp. Cell Res.* **229**:204-211
- ◆ **Lehner, Ch., Kurer, V., Eppenberger, H.M. und Nigg, E.A. (1986).** The nuclear lamin protein family in higher vertebrates. *J. Biol. Chem.* **261**:13293-13301
- ◆ **Lehner, C.F., Fürstenberger, G., Eppenberger, H.M. und Nigg, E.A. (1986).** Biogenesis of the nuclear lamina: In vivo synthesis and processing of the nuclear protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:2096-2099
- ◆ **Lehner, Ch., Stick, R. Eppenberger, H.M., und Nigg, E.A. (1987).** Differential expression of nuclear lamin proteins during chicken development. *J. Cell Biol.* **105**:577-587
- ◆ **Li, B., Pilcher, K.Y., Wyman, T.E. und Machida, C.A. (1997).** Rapid preparation and identification of insert-containing recombinant plasmid DNA. *BioTechniques* **23**:603-608
- ◆ **Lin, F. und Worman, H.J. (1993).** Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J. Biol. Chem.* **268**:16321-16326
- ◆ **Liu, J.G., Yuan, L., Brundell, E., Bjorkroth, B., Daneholt, B. und Hoog, C. (1996).** Localization of the N-terminus of SCP1 to the central element of the SC and evidence for direct interactions between the N-termini of SCP1 molecules organized head-to-head. *Exp. Cell Res.* **226**:11-19
- ◆ **Loewinger, L. und McKeon, F. (1988).** Mutations in the nuclear lamin proteins resulting in their aberrant assembly in the cytoplasm. *EMBO J.* **7**:2301-2309
- ◆ **Lourim, D. und Krohne, G. (1994).** Lamin-dependent nuclear envelope reassembly following mitosis: an argument. *Trends Cell Biol.* **4**:314-318
- ◆ **Lourim, D. und Krohne, G. (1998).** Chromatin binding and polymerization of the endogenous *Xenopus* egg lamins: Opposing effects of glycogen and ATP. *J Cell Sci.* **111**:3675-3686
- ◆ **Lutz, R.J., Trujillo, M.A., Denham, K.S., Wenger, L. und Sinensky, M. (1992).** Nucleoplasmic localization of prelamin A: Implications for prenylation-dependent lamin A assembly into the nuclear lamina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:3000-3004

- ◆ **Machiels, B.M., Zorenc, A.H.G., Endert, J.M., Kuijpers, H.J.H., van Eys, G.J.J.M., Ramaekers, F.C. and Broers, J.L.V. (1995).** An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. *J. Biol. Chem.* **271**:9249-9253
- ◆ **Maison, C., Pyrpasopoulou, A., Theodoropoulos, P.A. und Georgatos, S.D. (1997).** The inner nuclear membrane protein LAP1 forms a native complex with B-type lamins and partitions with spindle-associated mitotic vesicles. *EMBO J.* **16**:4839-4850
- ◆ **Malkov, M., Fisher, Y. und Don, J. (1998).** Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.* **59**:84-92
- ◆ **Marshall, I.C.B. und Wilson, K.L. (1997).** Nuclear envelope assembly after mitosis. *Trends Cell Biol.* **7**:69-73
- ◆ **Martin, L., Crimando, C. und Gerace, L. (1995).** cDNA cloning and characterization of lamina-associated-polypeptide 1C (LAP1C), an integral protein of the inner nuclear membrane. *J. Biol. Chem.* **270**:8822-8828
- ◆ **Matsudaira, P.T. (1987).** Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**:10035-10038
- ◆ **McKeon, F. (1991).** Nuclear lamin proteins: domains required for nuclear targeting, assembly, and cell-cycle-regulated dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**: 82-86
- ◆ **McKeon, F., Kirschner, M.W. und Caput, D. (1986).** Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* **319**:463-468
- ◆ **Meistrich, M. (1977).** Separation of spermatogenic cells and nuclei from rodent testes. *Methods Cell Biol.* **15**:15-54
- ◆ **Meuwissen, R.L., Offenbergh, H.H., Dietrich, A.J. Riesewijk, A., van Iersel, M. und Heyting, C. (1992).** A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J.* **11**:5091-5100
- ◆ **Meuwissen, R.L., Meerts, I., Hoovers, J.M., Leschot, N.J. und Heyting, C. (1997).** Human synaptonemal complex protein 1 (SCP1): Isolation and characterization of the cDNA and chromosomal localization of the gene. *Genomics* **39**:377-384
- ◆ **Mical, T.I. und Monteiro, M.J. (1998).** The role of sequences unique to nuclear intermediate filaments in the targeting and assembly of human lamin B: evidence for lack of interaction of lamin B with its putative receptor. *J. Cell Sci.* **111**:3471-3485
- ◆ **Moens, P.B. (1993).** Molecular perspectives of chromosome pairing at meiosis. *BioEssays* **16**:101-106
- ◆ **Moens, P.B., Pearlman, R.E., Heng, H.H. und Traut, W. (1998).** Chromosome cores and chromatin at meiotic prophase. *Curr. Top. Dev. Biol.* **37**:241-262
- ◆ **Moens, P.B. und Pearlman, R.E. (1990).** Telomere and centromere DNA are associated with the cores of meiotic prophase chromosomes. *Chromosoma* **100**:8-14
- ◆ **Moens, P.B. und Spyropoulos, B. (1995).** Immunocytology of chiasmata and chromosomal disjunction at mouse meiosis. *Chromosoma* **104**:175-182
- ◆ **Moens, P.B., Heyting, C., Dietrich, A.J., van Raamsdonk, W. und Chen, Q. (1987).** Synaptonemal complex antigen location and conservation. *J. Cell Biol.* **105**:93-103

- ◆ **Moir, R.D., Donaldson, A.D. und Stewart, M. (1991).** Expression in *Escherichia coli* of human lamins A and C: Influence of head and tail domains on assembly properties and paracrystal formation. *J. Cell Sci.* **99**: 363-372
- ◆ **Moir, R.D., Spann, T.P. und Goldman, R.D. (1995).** The dynamic properties and possible functions of nuclear lamins. *Int. Rev. Cytol.* **162B**: 141-182
- ◆ **Moir, R.D., Spann, T.P., Herrman, H. und Goldman, R.D. (2000).** Disruption of the nuclear lamin organization blocks the elongation phase of DNA replication. *J. Cell Biol.* **149**:1179-1192
- ◆ **Moir, R.D., Spann, T.P., Lopez-Soler, R.I., Yoon, M., Goldman, A.E., Khuon, S. und Goldman, R.D. (2000).** Review: The dynamics of the nuclear lamins during the cell cycle-relationship between structure and function. *J. Struct. Biol.* **129**:324-334

- ◆ **Nakajima, N. und Abe, K. (1995).** Genomic structure of the mouse A-type lamin gene encoding somatic and germ cell-specific lamins. *FEBS Lett.* **365**:108-114
- ◆ **Nakajima, N. und Sado, T. (1993).** Nucleotide sequence of a mouse lamin A cDNA and its deduced amino sequence. *Biochim. Biophys. Acta* **1171**:311-314
- ◆ **Nakamachi, K. und Nakajima, N. (2000).** DNase I hypersensitive sites and transcriptional activation of the lamin A/C gene. *Eur. J. Biochem.* **267**:1416-1422
- ◆ **Napoli, J.L. (1999).** Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1440**:139-162
- ◆ **Navolanic, P.M. und Sperry, A.O. (2000).** Identification of isoforms of a mitotic motor in mammalian spermatogenesis. *Biol. Reprod.* **62**:1360-1369
- ◆ **Nigg, E.A. (1992).** Assembly-disassembly of the nuclear lamina. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**:105-109
- ◆ **Nigg, E.A. (1997).** Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* **386**:779-787
- ◆ **Nikolakaki, E., Meier, J., Simos, G., Georgatos, S.D. und Giannakouros, T. (1997).** Mitotic phosphorylation of the lamin B receptor by a serine/arginine kinase and p34(cdc2). *J. Biol. Chem.* **272**:6208-6213

- ◆ **Odorisio, T., Rodriguez, T.A., Evans, E.P., Clarke, A.R. und Burgoyne, P.S. (1998).** The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis. *Nat. Genet.* **18**:257-261
- ◆ **O'Farrell, P.H. (1975).** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**:4007-4021
- ◆ **Offenberg, H.H., Schalk, J.A., Meuwissen, R.L., van Aalderen, M., Kester, H.A., Dietrich, A.J. und Heyting, C. (1998).** SCP2: A major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of rat. *Nucleic Acids Res.* **26**:2572-2579
- ◆ **Okumura, K., Nakamachi, K., Hosoe, Y. und Nakajima, N. (2000).** Identification of a novel retinoic acid-responsive element within the lamin A/C promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**:197-202

- ◆ **Ottaviano, Y. und Gerace, L. (1985).** Phosphorylation of the nuclear lamins during interphase and mitosis. *J. Biol. Chem.* **260**:624-632
- ◆ **Paddy, M.R., Belmont, A.S., Saumweber, H., Agard, D.A. und Sedat, J.W. (1990).** Interphase nuclear envelope lamins form a discontinuous network that interacts with only one fraction of the chromatin in the nuclear periphery. *Cell* **62**:89-106
- ◆ **Pandita, T.K., Westphal, C.H., Anger, M., Sawant, S.G., Geard, C.R., Pandita, R.K. und Scherthan, H. (1999).** *Atm* inactivation results in aberrant telomere clustering during meiotic prophase. *Mol. Cell. Biol.* **19**:5096-5105
- ◆ **Parvinen, M. und Söderström, K.O. (1976).** Chromosome rotation and formation of synapsis. *Nature* **260**:534-535
- ◆ **Paulin-Levasseur, M., Blake, D.L., Julien, M. and Rouleau, L. (1996).** The MAN antigens are non-lamin constituents of the nuclear lamina in vertebrate cells. *Chromosoma* **104**:367-379
- ◆ **Pearlman, R.E., Tsao, N. und Moens, P.B. (1992).** Synaptonemal complexes from DNase-treated rat pachytene chromosomes contain (GT)_n and LINE/SINE sequences. *Genetics* **130**:865-872
- ◆ **Peter, M. und Nigg, E.A. (1991).** Ectopic expression of an A-type lamin does not interfere with differentiation of lamin A-negative embryonal carcinoma cells. *J. Cell Sci.* **100**:589-598
- ◆ **Peter, M., Kitten, G.T., Lehner, C.F., Vorburger, K., Bailer, S.M., Maridor, G., und Nigg, E.A. (1989).** Cloning und sequencing of cDNA clones encoding chicken lamins A and B1 and comparison of the primary structures of vertebrate A- and B-type lamins. *J. Mol. Biol.* **208**:393-404
- ◆ **Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J.C. und Nigg, E.A. (1990).** *In vitro* disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* **61**:591-602
- ◆ **Peter, M., Heitlinger, E., Haner, M., Aebi, U. und Nigg, E.A. (1991).** Disassembly of *in vitro* formed lamin head-to-tail polymers by cdc2-kinase. *EMBO J.* **10**:1535-1544
- ◆ **Picard, A., Capony, J.P., Brautigan, D.L. und Doree, M. (1989).** Involvement of protein phosphatases 1 and 2a in the control of M phase-promoting factor in starfish. *J. Cell Biol.* **109**:3347-54
- ◆ **Pittman, D.L. und Schimenti, J.C. (1998).** Recombination in the mammalian germ line. *Curr. Top. Dev. Biol.* **37**:1-35
- ◆ **Plug, A.W., Peters, A.H., Keegan, K.S., Hoekstra, M.F., de Boer, P. und Ashley, T. (1998).** Changes in protein composition of meiotic nodules during mammalian meiosis. *J. Cell Sci.* **111**:413-423
- ◆ **Pugh, G.E., Coates, P.J., Lane, E.B., Raymond, Y. und Quinlan, R.A. (1997).** Distinct nuclear assembly pathways for lamins A and C lead to their increase during quiescence in the Swiss 3T3 cells. *J. Cell Sci.* **110**:2483-2493
- ◆ **Raju, R.V., Kakkar, R., Radhi, J.M. und Sharma, R.K. (1997).** Biological significance of phosphorylation and myristoylation in the regulation of cardiac muscle proteins. *Mol. Cell Biol.* **17**:135-143

- ◆ **Rattner, J.B., Goldsmith, M. und Hamkalo, B.A. (1980).** Chromatin organization during meiotic prophase of *Bombyx mori*. *Chromosoma* **79**:215-224
- ◆ **Ravnik, S.E. und Wolgemuth, D.J. (1996).** The developmentally restricted pattern of expression in the male germ line of a murine cyclin A, cyclin A2, suggest a roles in both mitotic and meiotic cell cycles. *Dev. Biol.* **173**: 69-78
- ◆ **Resh, M.D. (1999).** Fatty acylation of proteins: new insights into the membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1451**:1-16
- ◆ **Riedel, W. und Werner, D. (1989).** Nucleotide sequence of the full-length mouse lamin C cDNA and its deduced amino-acid sequence. *Biochim. Biophys. Acta* **1008**:119-122
- ◆ **Rohwedel, J., Guan, K. und Wobus, A.M. (1999).** Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro. *Cells Tissues Organs* **165**:190-202
- ◆ **Russell, L. (1977).** Desmosome-like junctions between Sertoli and germ cells in the rat testis. *Am. J. Anat.* **148**:301-312

- ◆ **Sasseville, A.M. und Raymond, Y. (1995).** Lamin A precursor is localized to intranuclear foci. *J. Cell Sci.* **108**:273-285
- ◆ **Sawin, K.E. und Endow, S.A. (1993).** Meiosis, mitosis and microtubule motors. *BioEssays* **15**:399-407
- ◆ **Scherthan, H., Eils, R., Trelles-Sticken, E., Dietzel, S., Cremer, T., Walt, H. und Jauch, A. (1998).** Aspects of three-dimensional reorganization during the onset of human male prophase. *J. Cell Sci.* **111**:2337-2351
- ◆ **Scherthan, H., Weich, S., Schwegler, H., Heyting, C., Harle, M. und Cremer, T. (1996).** Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J. Cell Biol.* **134**:1109-1125
- ◆ **Schwacha, A. und Kleckner, N. (1997).** Interhomolog bias during meiotic recombination: meiotic functions promote a highly differentiated interhomolog-only pathway. *Cell* **90**:1123-1135
- ◆ **Senior, A. und Gerace, L. (1988).** Integral membrane proteins specific to the inner nuclear membrane and associated with the nuclear lamina. *J. Cell Biol.* **107**:2029-2036
- ◆ **Sinensky, M., Fantle, K., Trujillo, M., McLain, T., Kupfer, A. und Dalton, M. (1994a).** The processing pathway of prelamin A. *J. Cell Sci.* **107**:61-67
- ◆ **Sinensky, M., Fantle, K. und Dalton, M. (1994b).** An antibody which specifically recognizes prelamin A but not mature lamin A: application to detection of blocks in farnesylation-dependent protein processing. *Cancer Res.* **54**:3229-3232
- ◆ **Smith, A. und Benavente, R. (1992a).** Identification of a short nuclear lamin protein selectively expressed during meiotic stages of rat spermatogenesis. *Differentiation* **52**:55-60
- ◆ **Smith, A. und Benavente, R. (1992b).** Identification of a structural protein component of rat synaptonemal complex. *Exp. Cell Res.* **198**:291-297
- ◆ **Solari, A.J. (1993).** Sex chromosomes and sex determination in vertebrates. Boca Raton, Florida: CRC Press

- ◆ **Spann, T.P., Moir, R.D., Goldman, A.E., Stick, R. und Goldman, R.D. (1997).** Disruption of the nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *J. Cell Biol.* **136**:1201-1212
- ◆ **Speckman, R.A., Garg, A., Du, F. Bennett, L., Veile, R., Arioglu, E., Taylor, S.I., Lovett, M. und Bowcock, A.M. (2000).** Mutational and haplotype analysis of families with partial lipodystrophy (Dunnigan variety) reveal recurrent missense mutations in the globular C-terminal domain of lamin A/C. *Am. J. Hum. Genet.* **66**:1192-1198
- ◆ **Sperry, A.O. und Zhao, L.P. (1996).** Kinesin-related proteins in the mammalian testes: candidate motors for meiosis and morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* **7**:289-305
- ◆ **Steinert, P.M. und Roop, D.R. (1988).** Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu. Rev. Biochem.* **57**:593-625
- ◆ **Stern, H. (1993).** The process of meiosis. in *Cell and molecular biology of the testis*, (Claude Desjardins und Larry L. Ewing, Hrg.) Oxford University Press, pp.**296-331**
- ◆ **Stern, H. und Hotta, Y. (1987).** The Biochemistry of meiosis. in *Meiosis*, P.B. Moens (Hsg.), academic press, Orlando, pp.**245-274**
- ◆ **Stick, R. (1992).** The gene structure of *Xenopus* nuclear lamin A: a model for the evolution of A-type from B-type lamins by exon shuffling. *Chromosoma* **101**:566-574
- ◆ **Stuurman, N., Heins, S. und Aebi, U. (1998).** Nuclear lamins: Their structure, assembly, and interactions. *J. Struct. Biol.* **122**:42-66
- ◆ **Suganuma, M., Fujiki, H., Yoshizawa, S., Hirota, M., Nakayasu, M., Ojika, M., Wakamatsu, K. Yamada, K. und Sugimura, T. (1988).** Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promotor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:1768-1771
- ◆ **Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H. , Anver, M., Bhat, N., Nagashima, K., Stewart, C.L. und Burke, B. (1999).** Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* **147**:913-920
- ◆ **Taniura, H., Glass, C. und Gerace, L. (1995).** A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones *J. Cell Biol.* **131**:33-44
- ◆ **Tarsounas, M., Pearlman, R.E, Gasser, P.J., Park, M.S. und Moens, P.B. (1997).** Protein-protein interactions in the synaptonemal complex. *Mol. Biol. Cell* **8**:1405-1414
- ◆ **Tarsounas, M., Pearlman, R.E. und Moens, P.B (1999).** Meiotic activation of rat pachytene spermatocytes with okadaic acid: the behaviour of synaptonemal complex components SYN1/SCP1 and COR1/SCP3. *J. Cell Sci.* **112**:423-434
- ◆ **Thomas, J.O. und Kornberg, R.D. (1975).** An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**:2626-2630
- ◆ **Tiwari, B. und Parnaik, V.K. (1999).** Identification of altered DNA-protein interactions at the lamin A proximal promoter in quiescent hepatocytes. *Cell Mol. Biol.* **45**:865-875
- ◆ **Tiwari, B., Muralikrishna, B. und Parnaik, V.K. (1998).** Functional analysis of the 5' promoter region of the rat lamin A gene. *DNA Cell Biol.* **17**:957-965

- ◆ **Towler, D.A., Gordon, J.I., Adams, S.P. und Glaser, L. (1988).** The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annu. Rev. Biochem.* **57**:69-99
- ◆ **Vázquez-Nin, G.H., Flores, E., Echeverria, O.M., Merkert, H., Wettstein, R. und Benavente, R. (1993).** Immunocytochemical localization of DNA in SC of rat and mouse spermatocytes, and of chick oocytes. *Chromosoma* **102**:457-463
- ◆ **Vester, B., Smith, A., Krohne, G. und Benavente, R. (1993).** Presence of a nuclear lamina in pachytene spermatocytes of rat. *J. Cell Sci.* **104**:557-563
- ◆ **Vlcek, S., Just, H., Dechat, T. und Foisner, R. (1999).** Functional diversity of LAP2 α and LAP2 β in the postmitotic chromosome association is caused by an α -specific nuclear targeting domain. *EMBO J.* **18**:6370-6384
- ◆ **von Glasenapp, E. und Benavente, R. (2000).** Fate of meiotic lamin C2 in rat spermatocytes cultured in the presence of okadaic acid. *Chromosoma* **109**:117-122
- ◆ **von Wettstein, D., Rasmussen, S.W. und Holm, P.B. (1984).** The synaptonemal complex in genetic segregation. *Ann. Rev. Genet.* **18**:331-413
- ◆ **Vorburger, K., Lehner, C.F., Kitten, G.T., Eppenberger, H.M. und Nigg, E.A. (1989).** A second higher vertebrate B-type lamin. cDNA sequence determination and *in vitro* processing of chicken lamin B2. *J. Mol. Biol.* **208**:405-415
- ◆ **Ward, G.E. und Kirschner, M.W. (1990).** Identification of cell cycle-regulated phosphorylation sites on nuclear lamin C. *Cell* **61**:561-577
- ◆ **Weber, K., Plessmann, U. und Traub, P. (1989).** Maturation of nuclear lamin A involves a specific carboxy-terminal trimming, which removes the polyiso-prenylation site from the precursor; implications for the structure of the nuclear lamina. *FEBS Lett.* **257**:411-414
- ◆ **Weber, K., Plessmann, U. und Traub, P. (1990).** Protein chemical analysis of purified murine lamin B identifies two distinct polypeptides B1 and B2. *FEBS Lett.* **261**:361-364
- ◆ **Willumsen, B.M., Christensen, A., Hubbert, N.L., Papageorge A.G. und Lowy, D.R. (1984)** The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature* **310**:583-586
- ◆ **Wilson, K.L. (2000).** The nuclear envelope, muscular dystrophy and gene expression. *Trends Cell Biol.* **10**:125-129
- ◆ **Wiltshire, T., Park, C., Caldwell, K.A. und Handel, M.A. (1995).** Induced premature G2/M-phase transition in pachytene spermatocytes includes events unique to meiosis. *Dev. Biol.* **169**:557-567
- ◆ **Wolda, S.L. und Glomset, J.A. (1988).** Evidence for modification of lamin B by a product of mevalonic acid. *J. Biol. Chem.* **263**: 5997-6000
- ◆ **Wolf, K.W. (1994).** How meiotic cells deal with non-exchange chromosomes. *BioEssays* **16**:107-114
- ◆ **Worman, H.J., Lazaridis, I. und Georgatos, S.D. (1988b).** Nuclear lamina heterogeneity in mammalian cells. Differential expression of the major lamins and variations in lamin B phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **263**:12135-12141

- ♦ **Wu, S. und Wolgemuth, D.J. (1995).** The distinct and developmentally regulated pattern of expression of members of the mouse *cdc25* gene family suggest differential functions during gametogenesis. *Dev. Biol.* **170**:195-206

- ♦ **Yang, L., Guan, T. und Gerace, L. (1997a).** Integral membrane proteins of the nuclear envelope are dispersed throughout the endoplasmic reticulum during mitosis. *J. Cell Biol.* **137**:1199-1210
- ♦ **Yang, L., Guan, T. und Gerace, L. (1997b).** Lamin-binding fragment of LAP2 inhibits increase in nuclear volume during cell cycle and progression into S-phase. *J. Cell Biol.* **139**:1077-1087
- ♦ **Ye, Q. und Worman, H.J. (1994).** Primary structure analysis and lamin B and DNA binding of human LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J. Biol. Chem.* **269**:11306-11311
- ♦ **Yuan, L., Pelttari, J., Brundell, E., Björkroth, B., Zhao, J., Liu, J.-G., Brismar, H., Daneholt, B. und Höög, Ch. (1998).** The synaptonemal complex protein SCP3 can form multistranded, cross-striated fibers in vivo. *J. Cell Biol.* **142**:331-339
- ♦ **Yuan, L., Liu, J.G., Zhao, J., Brundell, E., Daneholt, B. und Hoog, C. (2000).** The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol. Cell* **5**:73-83

- ♦ **Zickler, D. und Kleckner, N. (1998).** The Leptotene-Zygotene transition of meiosis. *Ann. Rev. Genet.* **32**:619-707
- ♦ **Zickler, D. und Kleckner, N. (1999).** Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu. Rev. Genet.* **33**:603-754

9. Curriculum vitae

Zur Person

Mein Name ist Elisabeth von Glasenapp und ich wurde am 6. August 1968 als einzige Tochter von Ottoernst und Lieselotte von Glasenapp in Osnabrück geboren. Ich bin derzeit wohnhaft Erlenstr.12 in 89077 Ulm.

Schulausbildung

Ich wuchs in Osnabrück bis zu meinem 20.Lebensjahr auf und besuchte in dieser Zeit die Rückertschule von 1975 bis 1979, anschließend die Orientierungsstufe Innenstadt von 1979 bis 1981 und von 1981 bis 1988 das Ratsgymnasium in Osnabrück, das ich 1988 mit dem Abitur abschloß.

Hochschulstudium

Das Studium der Biologie begann ich im folgenden Wintersemester 1988/89 an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg, wo ich am 14.05.91 die Diplom-Vorprüfung ablegte. Das Hauptstudium mit der Fächerkombination Mikrobiologie, Humangenetik, Pflanzenphysiologie und Geographie beendete ich am 16.06.1995 mit der Diplomprüfung. Das Thema der Diplomarbeit lautete Molekulargenetische Untersuchungen zu X-gebundener geistiger Behinderung des Menschen : FRAXE: ein fragile Stelle als Beispiel für eine Trinukleotid-Repeat-Expansion.

Arbeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin

Seit dem 01.04.96 arbeite ich im Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie der Universität Würzburg auf dem Gebiet der Spermatogenese der Ratte. Das Thema der Dissertation lautet: Lamin C2: Lokalisation und potentielle Funktion dieses meiosespezifischen A-Typ-Lamins in Pachytänspermatozyten der Ratte.

Seit 1.12.99 Mitarbeiterin in der Abteilung Anatomie und Zellbiologie der Universität Ulm.